

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Interrelación entre el Virus de la Gripe  
y la Cromatina Celular: Estudio del  
Remodelador de Cromatina CHD6,  
Modulador Negativo de la Infección Viral

TESIS DOCTORAL

ROBERTO ALFONSO DUNN  
JULIO 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

# Interrelación entre el Virus de la Gripe y la Cromatina Celular: Estudio del Remodelador de Cromatina CHD6, Modulador Negativo de la Infección Viral

Memoria presentada por Roberto Alfonso Dunn  
para optar al título de Doctor

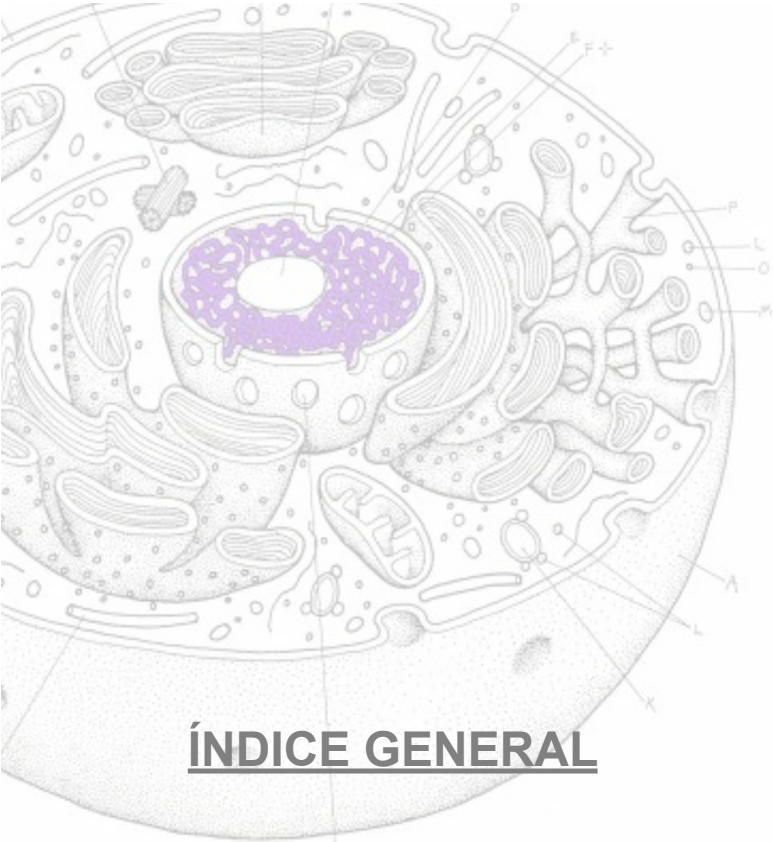
Madrid, Julio 2011

El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Amelia Nieto Martín.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca pre-doctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia.







# ÍNDICE

## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS.....	15
SUMMARY.....	21
INTRODUCCIÓN.....	25
EL VIRUS DE LA GRIPE.....	25
1. INTRODUCCIÓN Y GENERALIDADES	
2. CLASIFICACIÓN	
3. ORGANIZACIÓN DE LA PARTÍCULA VIRAL Y PROTEÍNAS VIRALES	
4. ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y RNAs VIRALES SINTETIZADOS EN LA CÉLULA INFECTADA	
4.1 vRNAs o RNAs genómicos	
4.2 cRNAs o RNAs complementarios	
4.3 mRNAs o RNAs mensajeros	
5. LA RNP VIRAL	
5.1 La polimerasa viral	
5.1.1 La subunidad PB1	
5.1.2 La subunidad PB2	
5.1.3 La subunidad PA	
5.2 La Nucleoproteína o NP	

## **EL CICLO DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE..... 30**

1. **ENTRADA DE LAS PARTÍCULAS VIRALES**
2. **TRANSCRIPCIÓN Y REPLICACIÓN DEL RNA VIRAL**
  - 2.1 **La transcripción**
  - 2.2 **La replicación**
3. **PROCESAMIENTO DE LOS mRNAs Y SÍNTESIS DE PROTEÍNAS VIRALES**
4. **MORFOGÉNESIS: ENSAMBLAJE DE vRNPs Y LIBERACIÓN DE NUEVAS PARTÍCULAS**

## **CROMATINA CELULAR: REGULADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN CELULAR..... 34**

1. **EL NUCLEOSOMA Y LAS HISTONAS**
2. **MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA CROMATINA CELULAR IMPLICADOS EN TRANSCRIPCIÓN CELULAR**
  - 2.1 **Modificaciones de histonas**
    - 2.1.1 **Metilación de histonas**
      - 2.1.1.1 **Metilación de lisinas de histona y activación transcripcional**
      - 2.1.1.2 **Metilación de lisinas de histona y represión transcripcional**
    - 2.1.2 **Demetilación de residuos de lisina**
  - 2.2 **Remodeladores de cromatina dependientes de ATP**
    - 2.2.1 **Familia CHD de remodeladores de cromatina dependientes de ATP**
      - 2.2.1.1 **Subfamilia III: CHD6-CHD9 y KIS-L**
      - 2.2.1.2 **Caracterización de la familia CHD como “lectores” de residuos de lisina metilados**

## **LOS VIRUS MANIPULAN LA CROMATINA CELULAR..... 43**

1. **VIRUS DNA**
  - 1.1 **Herpesvirus**
  - 1.2 **Papilomavirus**
  - 1.3 **Adenovirus**
2. **VIRUS RNA**
  - 2.1 **VIH y otros virus RNA que se integran en el genoma**
  - 2.2 **El virus de la gripe**

ANTECEDENTES: BUSQUEDA DE FACTORES ASOCIADOS A LA SUBUNIDAD PA DEL VIRUS DE LA GRIPE.....

49

OBJETIVOS.....

51

MATERIALES Y MÉTODOS.....

55

MATERIALES BIOLÓGICOS.....

55

1. LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS

2. BACTERIAS

3. VIRUS

4. PLÁSMIDOS

5. ANTICUERPOS

6. RESINAS DE AFINIDAD

7. REACTIVOS, DROGAS Y OTROS MATERIALES BIOLÓGICOS

MÉTODOS.....

57

1. MANIPULACIÓN DE DNA Y CLONAJES.....

57

2. MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES.....

57

2.1 Mantenimiento de cultivos celulares

2.2 Transfecciones

2.3 Aislamiento de núcleos

2.4 Reconstitución de RNPs virales y medida de actividad luciferasa

2.5 Generación de líneas celulares estables

2.5.1 HEK293T-TM, -siCHD6.1, -siCHD6.2

2.5.2 A549-TM, -siCHD6.1, -siCHD6.2

3. TÉCNICAS VIROLÓGICAS.....

58

3.1 Infecciones en células de cultivo

3.2 Generación de stocks de virus

3.3 Titulación de virus mediante ensayo de placa

3.4 Curvas de crecimiento

3.5 Infecciones en ratones	
4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	60
4.1 <i>Western blot</i>	
4.2 Inmunoprecipitación de CHD6	
4.3 Ensayo de unión a péptidos sintéticos de histona 3 ( <i>pull-down</i> )	
4.4 Inmunofluorescencia	
RESULTADOS.....	67
1. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE CHD6 CON LA POLIMERASA VIRAL.....	67
1.1 CHD6 y PB2 interaccionan <i>in vivo</i>	
1.2 CHD6 interacciona con los complejos de las RNPs virales durante la infección	
2. ESTUDIO DE LA RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA CELULAR CHD6 EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE.....	69
2.1 Construcción de células HEK293T y A549 CHD6 silenciadas	
2.2 La actividad de las RNPs virales aumenta en células con niveles de CHD6 reducidos	
2.3 Niveles bajos de CHD6 aumentan la acumulación de partículas virales de la gripe en infecciones a baja multiplicidad	
3. ESTUDIO DEL EFECTO QUE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE TIENE SOBRE LA PROTEÍNA CHD6.....	72
3.1 La distribución intranuclear de CHD6 cambia durante la infección	
3.2 La infección por el virus de la gripe provoca la degradación de CHD6	
3.2.1 CHD6 es degradada en infecciones tanto por cepas de laboratorio como por cepas naturales del virus de la gripe	
3.2.2 Cepas atenuadas del virus de la gripe también degradan CHD6	
3.2.3 Infecciones con adenovirus y VSV no producen degradación de CHD6	
3.2.4 CHD6 es degradado en ratones infectados con virus de la gripe	
3.2.5 Mecanismo de degradación: es independiente del proteosoma y el complejo de la polimerasa viral es suficiente para inducir la degradación de CHD6	

4. CHD6 SE RELOCALIZA A CROMATINA INACTIVA DURANTE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE.....	79
4.1 Análisis de la metilación de lisinas en la cola de la histona 3	
4.2 CHD6 se asocia con las colas de la histona 3 metiladas y su patrón de unión cambia en infección por el virus de la gripe	
4.3 Las ribonucleoproteínas virales (RNPs) y CHD6 co-localizan con el marcador de heterocromatina H3K9 tri-metilado	
4.4 CHD6 no media la asociación de NP con cromatina inactiva	
DISCUSIÓN.....	89
1. Identificación de la proteína CHD6 como nuevo factor asociado a las RNPs virales que actúa como modulador negativo de la replicación del virus de la gripe.....	89
1.1 El virus de la gripe se relaciona con CHD6 y otras proteínas asociadas a cromatina	
1.2 ¿Es CHD6 un modulador de la actividad antiviral?	
1.3 Posible implicación de otros miembros CHD en la infección por el virus de la gripe	
1.4 Posibles mecanismos de inhibición viral llevados a cabo por CHD6	
2. CHD6 cambia su distribución intranuclear y se degrada durante la infección por el virus de la gripe.....	91
2.1 Redistribución de CHD6 durante la infección por el virus de la gripe: análisis desde el contexto nuclear	
2.2 Proceso de degradación de CHD6: similitudes y diferencias con respecto a la degradación de la RNAP II	
2.3 Implicación del bloqueo de la transcripción celular en la degradación de la RNAP II y CHD6	
3. Relocalización de CHD6 en cromatina transcripcionalmente inactiva.....	96
3.1 El virus de la gripe, CHD6 y cromatina celular: ¿dónde mirar?	
3.2 Solo la infección por el virus de la gripe induce el reclutamiento de CHD6 a varios de los marcadores epigenéticos utilizados	
3.3 NP también se une a regiones ricas en H3K9me3: implicaciones funcionales de esta	

asociación

3.4 CHD6 y NP en cromatina inactiva: posibles mecanismos de reclutamiento

3.5 El reclutamiento de proteínas nucleares en regiones transcripcionalmente reprimidas  
como posible mecanismo de inactivación funcional

4. Reducción en los niveles de H3K4me3 y su posible implicación en *shut-off* viral..... 98

4.1 La reducción en H3K4me3 ocurre concomitante a las degradaciones de CHD6 y RNAP II

4.2 ¿El virus de la gripe manipula epigenéticamente la transcripción de la célula huésped?

CONCLUSIONES..... 101

BIBLIOGRAFÍA..... 103

ANEXO..... 123

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## INTRODUCCIÓN

Figura I1. El virus de la gripe.....	26
Figura I2. Síntesis de los distintos tipos de RNA virales.....	27
Figura I3. La polimerasa del virus de la gripe.....	29
Figura I4. Esquema del ciclo infectivo del virus de la gripe.....	31
Figura I5. Cromosomas, nucleosomas e histonas.....	34
Figura I6. Mecanismos de regulación de la cromatina celular.....	35
Figura I7. Modificaciones post-traduccionales de histonas.....	36
Figura I8. Distribución a nivel genómico de modificaciones de histonas relevantes en el proceso de transcripción celular.....	37
Figura I9. Datos de interacción en ensayo de doble híbrido utilizando la proteína PA viral como cebo.....	49
Tabla I1. Familia CHD de remodeladores de cromatina dependientes de ATP.....	40
Tabla I2. Ejemplos de proteínas virales y sus dianas celulares asociadas con la cromatina de la célula huésped.....	45

## MATERIALES Y MÉTODOS

Figura M1. Reconstitución de RNPs virales recombinantes y expresión de actividad luciferasa.	58
Figura M2. Ensayo de unión a péptidos sintéticos de histona 3 ( <i>pull-down</i> ).....	60
Tabla M1. Anticuerpos para <i>Western blot</i> .....	59
Tabla M1. Anticuerpos para Inmunofluorescencia.....	61

## RESULTADOS

Figura R1. Análisis de la interacción de CHD6 con proteínas de la polimerasa del virus de la gripe.....	68
Figura R2. Colocalización de CHD6 y NP en el núcleo de células infectadas.....	68
Figura R3. Construcción de líneas celulares A549- y HEK293T- silenciadas para la proteína CHD6.. .....	69
Figura R4. Determinación de la actividad de RNPs virales en células silenciadas para CHD6....	70

Figura R5. Análisis del crecimiento viral en infecciones a baja MOI de células silenciadas para CHD6.....	71
Figura R6. Cambios en la distribución intranuclear de CHD6 durante la infección por el virus de la gripe.....	73
Figura R7. Estudio de la contribución de la inhibición transcripcional en el cambio en la distribución intranuclear de CHD6.....	73
Figura R8. Degradación de CHD6 durante la infección por el virus de la gripe.....	74
Figura R9. Degradación de CHD6 en infecciones con cepas virales de laboratorio y aislados naturales.....	75
Figura R10. Estudio de la degradación de CHD6 en infecciones por cepas atenuadas del virus de la gripe.....	76
Figura R11. Análisis de la capacidad de degradación de CHD6 en infecciones por VSV y Adenovirus.....	76
Figura R12. Degradación de CHD6 en ratones infectados con el virus de la gripe.....	77
Figura R13. Análisis de la implicación del proteosoma en la degradación de CHD6.....	78
Figura R14. Degradación de CHD6 en células con polimerasa viral reconstituida.....	79
Figura R15. Análisis de la acumulación y del patrón de distribución intranuclear de los marcadores de cromatina activa e inactiva durante la infección viral.....	80
Figura R16. Análisis de la asociación <i>in vitro</i> de NP y CHD6 con péptidos sintéticos de la cola de histona 3.....	82
Figura R17. Cambios en la asociación de CHD6 con lisinas metiladas de la cola de la histona 3 durante la infección viral.....	83
Figura R18. Colocalización de CHD6 con NP y H3K9me3 en células infectadas por el virus de la gripe.....	84
Figura R19. Análisis de la implicación de CHD6 en la asociación de vRNPs con lisinas metiladas de la cola de la histona 3 durante la infección viral.....	84

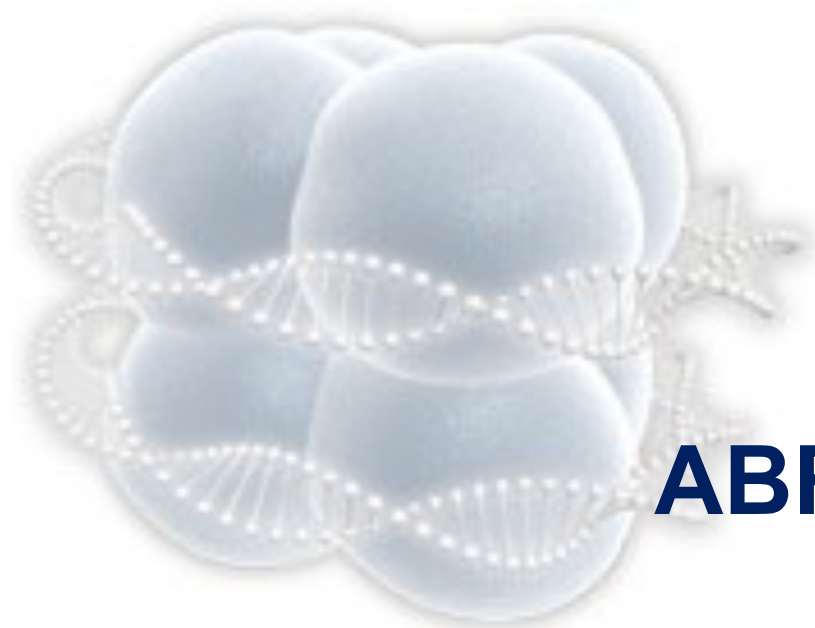
## DISCUSIÓN

Figura D1. El virus de la gripe y la maquinaria de transcripción celular: relación de amor y odio .....	92
Figura D2. Modelo representativo de la posible interrelación entre la maquinaria de transcripción celular, el remodelador de cromatina CHD6, la polimerasa del virus de la gripe y las regiones de cromatina transcripcionalmente activas o inactivas, durante el proceso de infección por el virus de la gripe.....	95









# ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

**Aa:** Aminoácido

**AAca:** Virus de la gripe A/Ann Arbor/6/60 *cold-adapted* (H2N2), cepa atenuada adaptada a multiplicarse a bajas temperaturas

**Ac:** Acetilo

**AdV:** AdenoVirus

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**ATP:** Adenina-trifosfato

**ATPasa:** Enzimas capaces de producir la hidrólisis de ATP en ADP y un ión fosfato libre. Esta reacción libera energía que es utilizada en la mayoría de los casos para poder llevar a cabo otra reacción química que se acopla a la reacción descrita

**BRD4:** *Bromodomain-containing protein 4*

**BRK:** dominio Brama y Kismet

**BSA:** Seroalbúmina bovina

**CAL:** Virus de la gripe de la cepa A/California/07/09 (H1N1)

**CD:** Cromodominio

**cDNA:** DNA complementario

**CHARGE:** *Coloboma of the eye, Heart defects, Atresia of the nasal choanae, Retardation of growth and/or development, Genital and/or urinary abnormalities, and Ear abnormalities and deafness*

**CHD:** *Chromodomain-Helicase/ATPase DNA-binding*

**ChIP:** Inmunoprecipitación de cromatina (*Chromatin Immunoprecipitation*)

**ChIP-CHIP:** ChIP acoplado a la tecnología de microarray génico

**ChIP-Seq:** ChIP acoplado a secuenciación masiva

**Cold adapted:** Adaptado a bajas temperaturas

**cRNA:** RNA complementario

**cRNP:** Ribonucleoproteína viral que contiene cRNA

**CTD:** *Carboxy Terminal Domain*

**C-terminal:** Carboxilo terminal

**DDB1:** Proteína de unión a DNA dañado-1 (*Damage-specific DNA Binding protein-1*)

**DMEM:** *Dulbecco Modified Eagle Medium*

**DMSO:** Dimetil SulfÓxido

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DNMT:** Metiltransferasa de DNA

**DRB:** Dicloro-beta-D-Ribofuranosil Bezimidazol

**EBV:** Virus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus*)

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetra-acético (*EthylenDiamine-Tetra acetic Acid*)

**Eng (E):** Virus de la gripe de la cepa A/England/1/51 (H1N1)

**Células ES:** Células madre embrionarias

**FACT:** *Facilitates Chromatin Transcription*

**FBS:** Suero fetal bovino

**G:** Guanina

**H:** Histona

**h:** Hora

**H1:** Histona 1

**H2A:** Histona 2A

**H2B:** Histona 2B

**H3:** Histona 3

**H4:** Histona 4

**H9N2:** Virus de la gripe de la cepa A/Turkey/Wisconsin/66 (H9N2)

**HA:** Hemaglutinina

**HAT:** Acetiltransferasa de histona

**HEK293T:** Tipo celular de riñón embrionario humano que expresa el antígeno T del virus SV40

**HP1 $\alpha$ :** Proteína de la heterocromatina 1  $\alpha$

**hpi:** Horas Post-Infección

**HPV:** Virus de Papiloma Humano (*Human Papilloma Virus*)

**Hsp70:** *Heat Shock Factor 70*

**HSV-1:** Virus herpes simplex tipo 1 (*Herpes Simplex Virus type-1*)

**HTLV-I:** Virus linfotrópico humano tipo 1 (*Human T-Lymphotropic Virus type-1*)

**IN:** Integrasa retroviral

**K:** Abreviación estándar del aminoácido de lisina

**KAP1:** *KRAB-ZFP-Associated Protein 1*

**KDa:** KiloDaltons

**KDM:** Demetilasa específica de residuo de lisina

**KMT:** Metiltransferasa específica de residuos de lisina

**KSHV:** Herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi (*Kaposi Sarcoma-associated HepesVirus*)

**Linker histone:** Histona de unión entre nucleosomas

**Lipid raft:** Balsa lipídica

**M1:** Proteína de Matriz-1 del virus de la gripe

**M2:** Proteína de Matriz-2 del virus de la gripe

**Mating type switching:** Proceso de cambio de tipo de apareamiento en levaduras.

**MDCK:** Tipo celular de riñón de perro (*Madin Darbey Canine Kidney*)

**me:** Metilo

**min:** Minuto

**ml:** Mililitro

**MOI:** Multiplicidad de infección (*Multiplicity of Infection*)

**mRNA:** RNA mensajero

**NA:** NeurAminidasa

**NC:** Virus de la gripe de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1)

**NEDD4:** *Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-regulated 4*

**NEP:** *Nuclear Export Protein*

**NES:** Señal de exportación nuclear (*Nuclear Export Signal*)

**NF90:** *Nuclear Factor 90*

**NLS:** Señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*)

**nm:** Nanómetro

**nM:** NanoMolar

**NP:** Nucleoproteína

**NRF2:** NF-E2-related factor-2

**NS1:** Proteína no estructural 1

**nt:** Nucleótido

**N-terminal (N):** Amino terminal

**Nuclear Speckles:** Estructuras subnucleares ricas en factores de *splicing*

**NuRD:** Complejo implicado en remodelación y deacetilación de nucleosomas (*Nucleosome Remodeling and Deacetylation complex*)

**OH:** Grupo hidroxilo

**ORF:** Fase abierta de lectura (*Open Reading Frame*)

**P/CAF:** *p300/CBP-Associated Factor*

**Panhandle:** Estructura en mango de sartén

**PARP-1:** *Poli-Adenil-Ribosil Polimerase-1*

**PAT157A:** Virus de la gripe rescatado con la mutación T157A en la subunidad PA

**PB1:** Proteína Básica 1

**PB2:** Proteína Básica 2

**PBCV-1:** Virus Paramecium bursaria Chlorella 1

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PBSc:** PBS completo

**PFU:** Unidades formadoras de placa (*Plaque Forming Unit*)

**PHD:** *Plant Homeo Domain*

**PHF2:** *PHD Finger protein 2*

**PML:** *ProMyelocytic Leukemia protein*

**PPARalpha:** *Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha*

**PR8:** Virus de la gripe de la cepa A/PR/8/34 (H1N1)

**pre-mRNA:** Precursor del RNA mensajero

**RB:** Retinoblastoma

**RBL2:** *RuvB-Like protein 2*

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RNAP II:** RNA polimerasa II

**RNP:** Ribonucleoproteína

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RT:** Temperatura ambiente (*Room Temperatura*)

**SANT:** Dominio Swi3, Ada2, N-CorR, TRIIIB

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**SDS-PAGE:** Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

**SFPQ:** *Splicing Factor Proline/Glutamine-Rich*

**shRNA:** Horquilla corta de RNA de doble cadena (*Short Hairpin RNA*)

**Shut off:** Proceso por el cual se inhibe la expresión de los mRNAs celulares durante la infección viral

**siRNA:** RNA pequeño interferente (*Small Interfering RNA*)

**snoRNPs:** Partículas ribonucleoproteicas nucleolares pequeñas

**snRNPs:** Partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas

**Spliceosome:** Complejo macromolecular que contiene la maquinaria de *splicing*

**Splicing:** Procesamiento del pre-mRNA por el que se eliminan secuencias intrónicas por corte y empalme

**SUV39H:** *Suppressor of Variegation 3-9 Homolog*

**SV40:** Virus vacuolado del simio 40

**Swi/Snf:** *Switching defective y Sucrose NonFermenting*

**TAT:** *Trans-Activator of Transcription*

**TM:** *Thermotoga Maritima*

**U:** Uridina

**Ub:** Ubiquitina

**Upstream:** Término relativo de lugar que indica que algo se encuentra más cercano al extremo 3' de la cadena molde del DNA que otra cosa

**UV:** Ultravioleta

**VIC:** Virus de la gripe de la cepa A/Victoria/3/75 (H3N2)

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**vRNA:** RNA genómico viral

**vRNP:** Ribonucleoproteína que contiene vRNA

**VS**: Virus de la Estomatitis Vesicular (**Vesicular Stomatitis Virus**)

**WB**: *Western blot*

**WSN**: Virus de la gripe de la cepa A/**WSN**/33 (H1N1)

**Wy**: Virus de la gripe de la cepa A/**Wyoming**/3/2003 (H3N2)

**µg**: Microgramo

**µl**: Microlitro









# *SUMMARY*

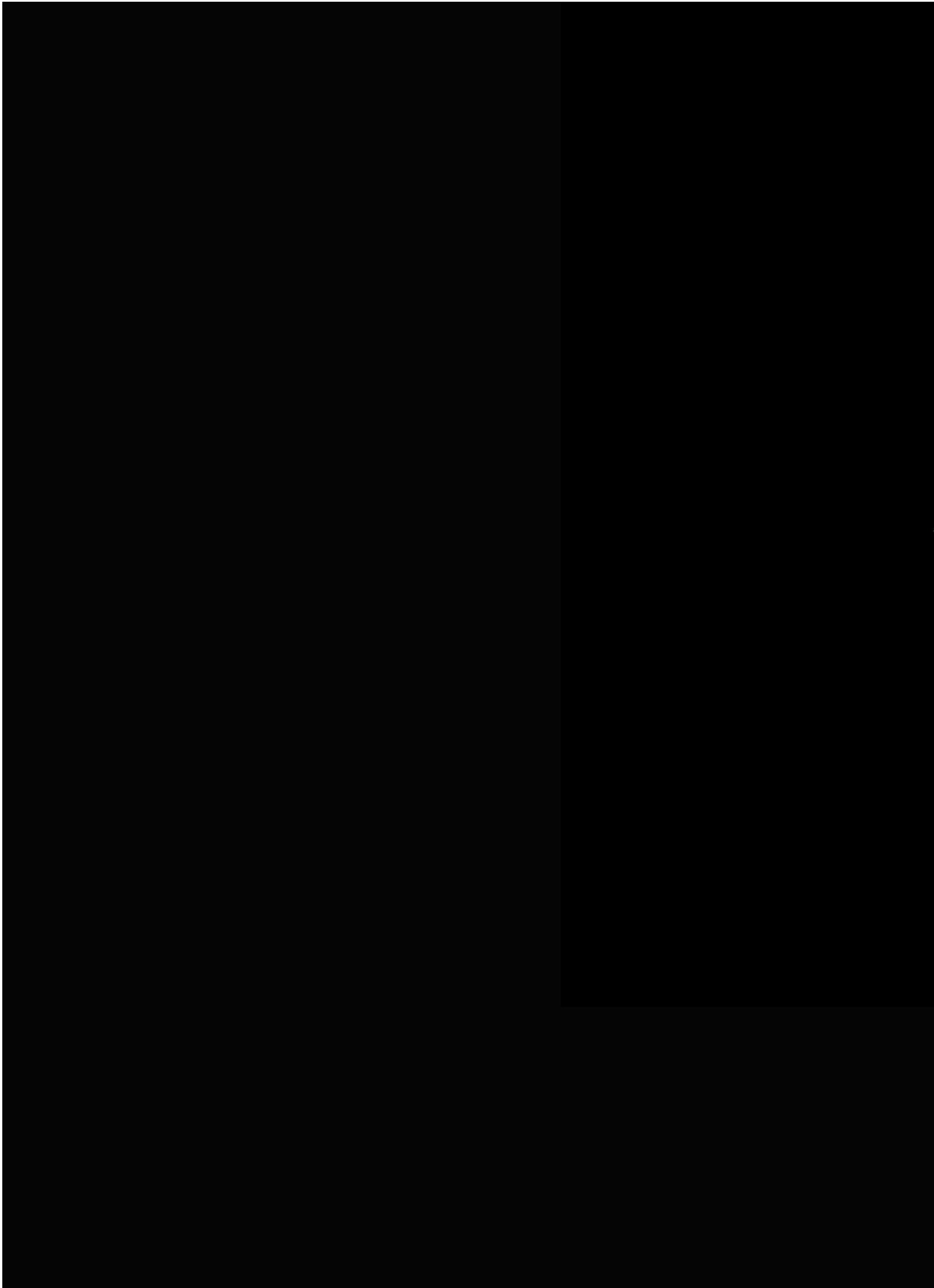
A significant body of evidence underlines the close relationship between influenza virus polymerase activity and the cellular transcription machinery as well as with nuclear chromatin. Nevertheless, once viral transcription is finished, RNA polymerase II is degraded and cellular transcription is disrupted, thus contributing to the observed cellular shut-off.

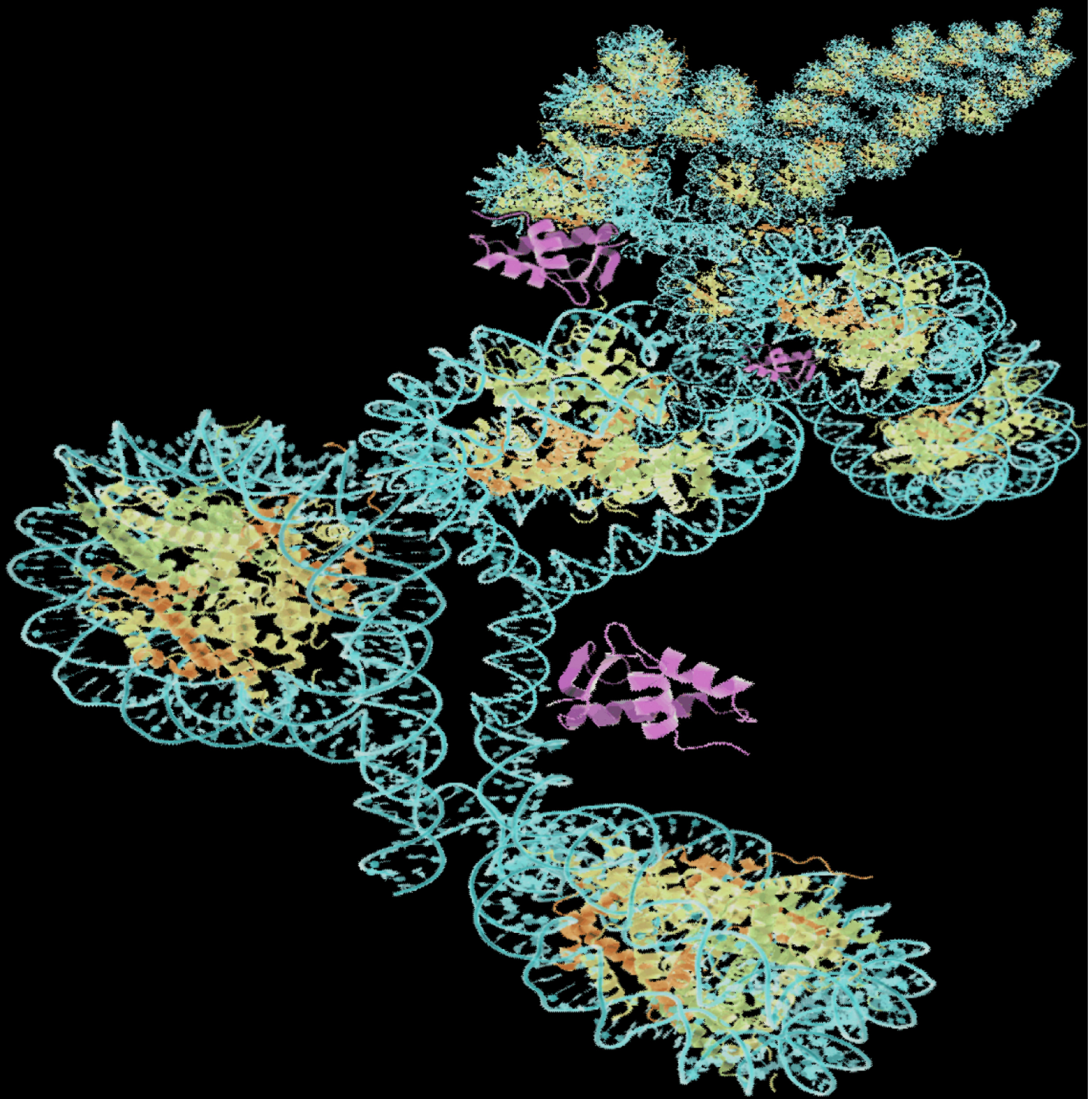
In this thesis, a new interaction of the viral polymerase with a nuclear transcription related factor, the chromatin remodeler CHD6 protein, is described. CHD6 interacts individually with PA and PB2 influenza virus polymerase subunits as well as with the entire polymerase complex. High virus titers were also obtained in CHD6 silenced cells, which highlights the role of CHD6 as a negative modulator of influenza virus growth.

Numerous nuclear processes are affected during influenza virus infection. Taking into consideration CHD6 binding to the viral polymerase, changes in CHD6 behavior during virus infection were assayed. We found that CHD6 intranuclear localization changes from a rather uniformly punctuated distribution to a granulated pattern within the infected cell. Moreover, at late time post-infection there is an increase in CHD6 and viral RNPs binding to trimethylated lysines of histone 3 tails that mark inactive chromatin (H3K9me3 and H3K27me3). A specific downregulation of H3K4me3 transcriptionally active mark could also be observed, which could be due to the profound cellular transcription obstruction initiated at intermediate times post-infection.

Additionally, It was also observed that infection with laboratory-passaged influenza virus strains and natural human isolates specifically degrades CHD6 protein. In contrast to what happens with RNAP II during influenza virus infection, CHD6 degradation is also triggered by the attenuated A/PR8/8/34 (PR8) and by the cold-adapted A/AnnArbor/6/60 (AA) strains, which are used as donor for vaccine seeds. Specific inhibitors of the proteasome pathway do not impede the degradation and, moreover, the expression of viral polymerase from its cloned cDNAs is sufficient to induce this effect. CHD6 degradation was also observed in lungs of influenza virus infected mice.

Relocalization of CHD6 to inactive chromatin and its specific degradation, as well as a decrease of H3K4me3, could constitute additional pathogenic events used by the influenza virus to induce host cell shut-off. The behavior of CHD6 during infection is also in accordance with its role as a negative modulator of the influenza virus infection.





# INTRODUCCIÓN



# EL VIRUS DE LA GRIPE

## 1. Introducción y Generalidades

La gripe es una enfermedad infecciosa causada por virus RNA de la familia *Orthomyxoviridae* y que afecta tanto a aves como a mamíferos. Los síntomas más comunes de la enfermedad son: fiebre alta, dolor de cabeza, postración y dolor muscular. Su alcance y mortalidad es especialmente importante en ciertos grupos de población, denominados “grupos de riesgo” (mayores de 65 años o individuos con patologías ya existentes). En España, se estima que la población de riesgo oscila entre 7 y 10 millones de personas.

Desde el punto de vista epidemiológico, la gripe se transmite rápidamente durante las epidemias estacionales afectando de un 10 a un 20% de la población general y, según informes de la OMS (Organización Mundial de la Salud), podría ser causante de entre 250.000 y 500.000 muertes cada año. Adicionalmente, también es responsable de pandemias de gran impacto, generalmente asociadas a profundos cambios antigénicos contra los que los seres humanos presentan una débil inmunidad. En el siglo pasado tuvieron lugar 3 pandemias que causaron decenas de millones de muertes y que fueron provocadas por la aparición de nuevas cepas de gripe en humanos (la gripe española de 1918, la gripe asiática de 1957, y la gripe de Hong Kong de 1968-69). A menudo, estas nuevas cepas surgen por la transmisión de una cepa ya existente desde una especie animal a humanos (conocido como salto “interespecies”), o cuando una cepa de humanos intercambia nuevos segmentos genómicos de otro virus influenza que normalmente infecta aves o cerdos (conocido como “reorganización” de segmentos genómicos). En Diciembre de 1997, apareció un nuevo subtipo aviar H5N1, proveniente de aves importadas desde China, susceptible de generar una nueva pandemia (Hatta et al., 2001). Sin embargo, a pesar de su elevada mortalidad, este virus no ha adquirido la capacidad de transmitirse entre humanos. Aun bajo la amenaza de la posible pandemia de gripe aviar, un nuevo subtipo H1N1 de origen porcino, se extendió desde México en junio de 2009 (Neumann et al., 2009). A diferencia del virus aviar H5N1, este subtipo se caracteriza por una alta transmisibilidad entre la población humana aunque con una menor mortalidad (Itoh et al., 2009). Estas características, junto con la globalización del mundo actual, han propiciado la expansión del virus en un tiempo récord.

La alta capacidad de transmisión, la facilidad para adaptarse a varios hospedadores y su enorme variabilidad, han hecho del virus de la gripe uno de los patógenos que más morbilidad y mortalidad ha causado en la historia. Por todo ello, el estudio de los mecanismos moleculares que gobiernan la infección es un requisito necesario e importante para aumentar el conocimiento sobre este patógeno.

## 2. Clasificación

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, cuyo nombre hace referencia a su capacidad hemaglutinante o de unión a mucus (del griego *myxo*). Esta familia se caracteriza por tener una envuelta lipídica y poseer un genoma segmentado de moléculas de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa.

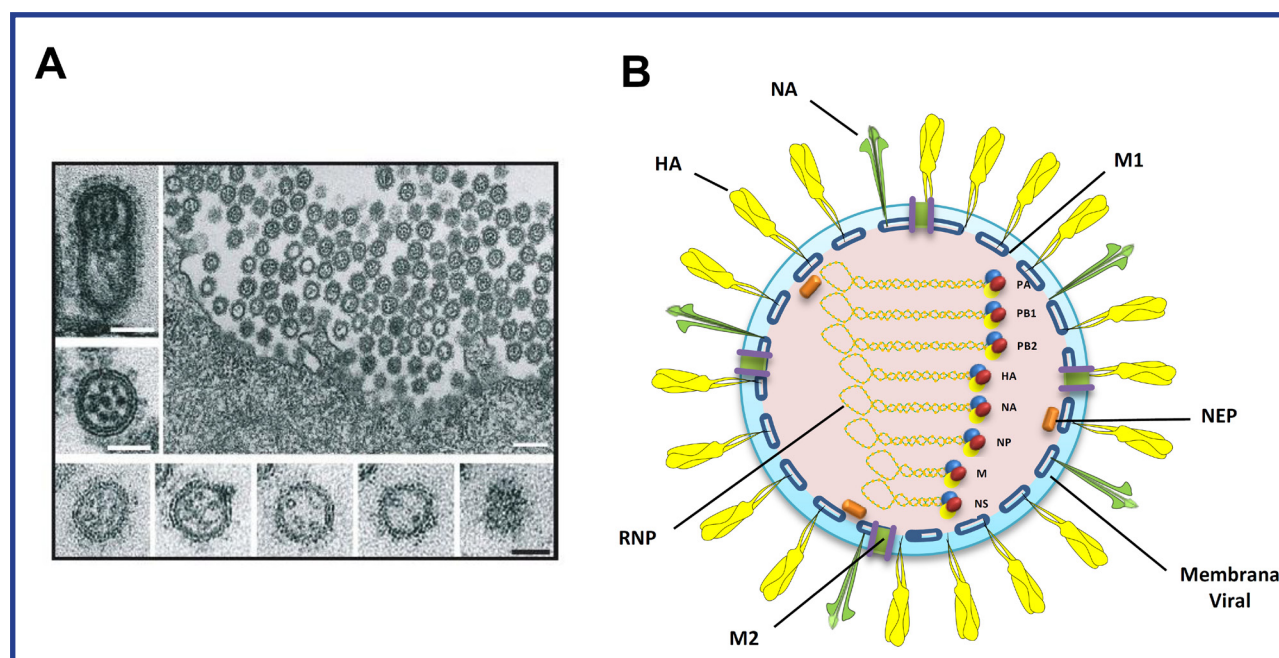
La familia *Orthomyxoviridae* incluye varios géneros: *influenzavirus A*, que presenta 8 segmentos genómicos e infecta humanos, otros mamíferos y una gran variedad de aves; *influenzavirus B*, también de 8 segmentos y que únicamente infecta humanos; *influenzavirus C*, que infecta humanos, perros y cerdos, y presenta 7 segmentos genómicos; *Thogoto-like virus* que incluye los virus Thogoto (con un genoma viral de 6 segmentos) y Dhori (de 7 segmentos); y el género *Isavirus* con 8 segmentos genómicos y cuyo componente más importante es el virus de la anemia del salmón.

Los géneros A, B y C se distinguen entre sí por las diferencias antigénicas presentes en las moléculas de nucleoproteína (NP) y en la proteína mayoritaria de la matriz, M1. Los *influenzavirus* tipo A se dividen a su vez en subtipos basándose en la naturaleza antigénica de las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). A lo largo de esta tesis se hará referencia exclusivamente a este género, ya que es el que más severamente afecta a humanos y constituye el principal modelo de estudio de laboratorio.

## 3. Organización de la Partícula Viral y Proteínas Virales

Los viriones presentan una morfología pleiomórfica y heterogénea aunque con tendencia a adquirir formas esféricas o filamentosas dependiendo de la cepa y el tipo de célula hospedadora (Horne et al., 1960; Hoyle et al., 1961) (**Fig. I1-A**). La partícula vírica se caracteriza por presentar una envuelta lipídica derivada de





**Figura 11. El virus de la gripe. (A)** Imágenes de viriones del virus de la gripe tomados por micrografía electrónica. La imagen de mayor tamaño corresponde a viriones saliendo de células MDCK a las 10 horas post-infección. Los puntos electrodensos en el interior del virión corresponden a las RNPs. Las imágenes pequeñas corresponden a secciones seriadas de un virión donde se observan 7 RNPs alineadas en forma de anillo con una octava RNP central. Adaptado de (Noda, 2006). **(B)** Representación gráfica de una partícula viral en la que se indican las proteínas estructurales del virus, las ocho RNPs y la membrana del virus derivada de la membrana celular.

la membrana plasmática de las células a las que infecta (Compans & Chopin, 1975) (**Fig. 11-B**). Expuestas en la membrana se encuentran las 2 glicoproteínas de membrana HA y NA, que son los principales determinantes antigénicos. La proteína **HA** (hemaglutinina), forma un homotrímero de estructura globular y sus funciones más relevantes son el reconocimiento del receptor, el ácido siálico, y la fusión con la membrana celular para permitir la entrada del virus. Existen al menos 16 subtipos diferentes de HA y solo 3 (H1, H2 y H3) se encuentran en virus influenza que infectan humanos. La proteína **NA** (neuraminidasa), que se organiza en un homotetrámero con forma de bastón, presenta actividad neuraminidasa y permite el corte de los residuos de ácido siálico tanto en la membrana celular como en viriones progenie. De esta forma favorece la salida del virus de la célula infectada y evita la agregación de los mismos (Palese & Compans, 1976; Palese & Schulman, 1974). La administración de inhibidores de neuraminidasa se utiliza como tratamiento que limita la severidad y la propagación de las infecciones por gripe. En la envuelta del virión también se localiza la proteína **M2** (Zebedee & Lamb, 1988). M2, en su forma tetramérica biológicamente activa, actúa como canal iónico que permite el paso de los protones desde los endosomas al interior de la partícula viral y, por consiguiente, facilita su desensamblaje (Holsinger & Lamb, 1991; Pinto et al., 1992;

Schnell & Chou, 2008). Bajo la envuelta lipídica se encuentra el armazón proteico del virus, compuesto principalmente por la proteína **M1** (**Fig. 11-B**), que es la proteína más abundante y la más conservada evolutivamente (Nayak et al., 2004). Unido a M1 en esta malla estructural se encuentra la proteína **NEP** (**Nuclear Export Protein**) (Richardson & Akkina, 1991; Yasuda et al., 1993), antes llamada NS2. NEP es la proteína estructural menos abundante en el virión y está implicada en la exportación de las RNPs fuera del núcleo celular (O'Neill et al., 1998).

En el interior de la matriz se encuentra el genoma segmentado del virus, organizado en ocho ribonucleoproteínas (**RNPs**) (**Fig. 11-B**). Cada una de ellas está compuesta por un segmento de RNA genómico superenrollado (Hsu et al., 1987) que se encuentra tapizado en toda su longitud por la nucleoproteína (**NP**) (Klumpp et al., 1997). Anclado a un extremo de la estructura que forman el genoma viral unido a NP, se encuentra la polimerasa viral dependiente de RNA compuesto, a su vez, por las subunidades PB1, PB2 y PA. Estas RNPs son las unidades básicas que llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción en el núcleo de la célula infectada.

Durante la infección también se expresan otras proteínas virales que no se encuentran en el virión. Estas proteínas son NS1 y dos proteínas

derivadas del segmento 2, PB1F2 y N40. La proteína no estructural **NS1** es un factor de virulencia no esencial que tiene múltiples funciones accesorias durante la infección (Hale et al., 2008). Aunque la principal función asignada a NS1 es la inhibición de la respuesta inmune iniciada por la célula infectada (Fernandez-Sesma, 2007), también se la ha relacionado con la modulación del proceso de *splicing* del mRNA viral (Garaigorta & Ortin, 2007) y la inhibición del *splicing* (Qiu et al., 1995), del procesamiento del extremo 3' (Chen et al., 1999) y del transporte núcleo-citosólico de los mRNAs celulares (Fortes et al., 1994). Además, modula la actividad de la polimerasa viral (Hatada et al., 1997; Hatada et al., 1992; Marión et al., 1997), participa en la morfogénesis (Garaigorta et al., 2005) y estimula selectivamente la traducción de los mRNAs virales (Aragón et al., 2000; Burgui et al., 2003; de la Luna et al., 1995).

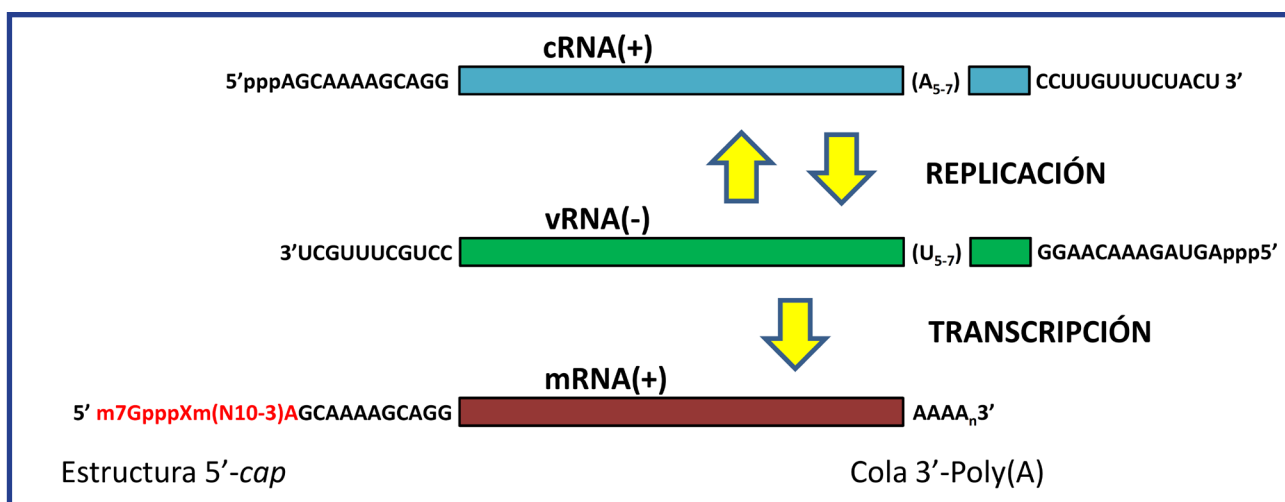
Las proteínas PB1F2 y N40, cuyas expresiones en la célula infectada han sido descritas recientemente (Chen et al., 2001; Wise et al., 2009), son sintetizadas a partir de una fase de lectura y un codón de iniciación alternativos del mensajero del segmento genómico 2, respectivamente. **PB1F2** presenta una rápida degradación dependiente del proteosoma, se localiza en la membrana mitocondrial y se le ha relacionado con procesos apoptóticos (Gibbs et al., 2003). PB1F2 también ha sido implicada en la regulación de la actividad de la polimerasa viral a través de su interacción con la subunidad PB1 (Mazur et al., 2008). La proteína **N40** es una versión truncada de PB1 que carece de

actividad transcriptasa y cuya eliminación provoca una disminución en la actividad replicativa en ciertos fondos genéticos (Wise et al., 2009).

## 4. Organización Genómica y RNAs Virales Sintetizados en la Célula Infectada

El genoma del virus de la gripe está formado por 8 segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa (Inglis et al., 1976). Con un tamaño total aproximado de 13500 nucleótidos, la longitud de los segmentos individuales se encuentra entre los 890 y los 2341 nucleótidos. En la célula infectada se expresan 12 proteínas virales donde cada segmento codifica una única proteína, excepto los segmentos 2, 7 y 8 (Chen et al., 2001; Lamb & Choppin, 1979; Lamb et al., 1980; Lamb & Lai, 1980; Lamb et al., 1981). Para cada uno de los RNAs mensajeros generados de los segmentos 7 y 8 se sintetizan por *splicing* alternativo 2 proteínas (M1 y M2 del segmento 7, y NS1 y NS2 del 8). El mRNA del segmento 2 contiene dos pautas de lectura abierta a partir de las cuales se expresan las proteínas PB1 y PB1-F2, y un codón de iniciación alternativo en la posición 40 que da lugar a la expresión de la proteína N40.

Se pueden distinguir tres formas distintas de RNA viral sintetizados por la polimerasa viral RNA dependiente dentro de la célula infectada (**Fig. I2**). La naturaleza, función y procedencia se describen a continuación.



**Figura I2. Síntesis de los distintos tipos de RNA virales.** Representado en verde se muestra el vRNA de polaridad negativa, que constituye la forma genómica a partir de la cual se generan el mRNA (de color marrón) en el proceso de transcripción viral y el cRNA (de color azul claro) como forma intermedia de la replicación viral.

#### 4.1 vRNAs o RNAs genómicos.

Los RNAs genómicos constituyen la forma de RNA presente en viriones y son cadenas sencillas de RNA de polaridad negativa. Presentan en sus extremos 5' un grupo trifosfato y en el 3' un grupo -OH (Young & Content, 1971). También tienen cerca del extremo 5' un tramo corto de entre 5 y 7 uridinas, que constituye la señal de poliadenilación (Holsinger & Lamb, 1991; Robertson, 1979) (**Fig. I2**). El vRNA siempre se encuentran formando complejos de ribonucleoproteínas (vRNPs) a través de su asociación con la polimerasa viral y múltiples monómeros de nucleoproteína (NP) (Neumann et al., 2004).

#### 4.2 cRNAs o RNAs complementarios

Son una copia completa y de polaridad positiva del vRNA que se genera mediante el proceso de replicación (**Fig. I2**). Los cRNAs son RNAs intermediarios de la replicación viral, ya que se utilizan como molde para generar copias de vRNA que serán incorporadas a la progenie viral. Al igual que el vRNA, en todo momento se encuentra formando cRNPs, pero éstas nunca salen del núcleo de la célula infectada (Shapiro et al., 1987).

#### 4.3 mRNAs o RNAs mensajeros

Son el producto de la transcripción del vRNA llevada a cabo por la polimerasa viral, y por lo tanto, de polaridad positiva. Son copias incompletas ya que carecen de la zona complementaria al extremo 5' del vRNA. En su lugar, poseen una cola de poli (A) en su extremo 3' que se genera a través de la copia reiterada, mediada por la polimerasa viral, de un tramo de uridinas cercano al extremo 5' del molde vRNA (**Fig. I2**). En su extremo 5' presenta un oligonucleótido heterogéneo de entre 10 y 13 nucleótidos de longitud que incluye una estructura *cap* tipo I ( $m^7GpppN$ ) procedente de pre-mensajeros (pre-mRNA) celulares transcritos por la RNA polimerasa II celular (RNAP II) (Krug et al., 1979). Estos oligonucleótidos con estructura *cap* son "robados" por la polimerasa viral gracias a su actividad endonucleolítica (Dias et al., 2009; Doan et al., 1999; Plotch et al., 1981), y son utilizados como oligonucleótidos cebadores en la transcripción viral. Debido a las modificaciones de ambos extremos, los mRNAs virales y celulares son estructuralmente indistinguibles.

### 5. La RNP Viral

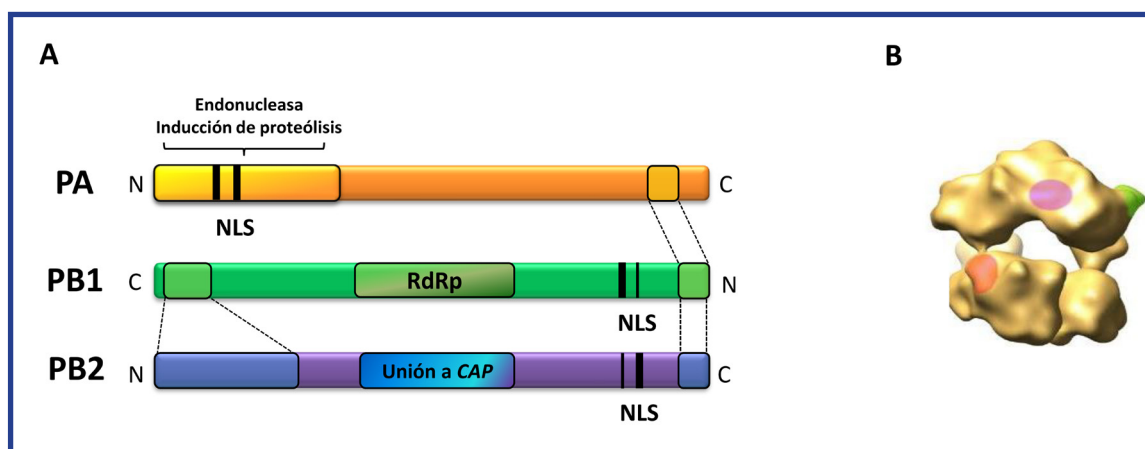
La forma activa en transcripción y replicación del genoma viral es la ribonucleoproteína (RNP), en la que cada segmento de vRNA o cRNA se encuentra individualmente encapsidado por la nucleoproteína (NP) y asociado a una copia de la RNA polimerasa dependiente de RNA del virus, formada por las subunidades PB1, PB2 y PA. La estructura de las RNPs ha sido confirmada por numerosos estudios de microscopía (Coloma et al., 2009; Martín-Benito et al., 2001; Ortega et al., 2000). Estos ensayos muestran estructuras en forma circular, helicoidal o superenrollada dependiendo de la longitud del molde RNA. Adicionalmente, el análisis estructural de las RNPs virales ha permitido determinar la presencia de la polimerasa viral en uno de los extremos, los residuos implicados en la interacción entre monómeros de NP fundamentales en la configuración estructural de la RNP, y la asociación independiente de secuencia de cada monómero de NP a 24 nucleótidos de RNA.

#### 5.1 La polimerasa viral

La enzima responsable de la síntesis de RNA viral en el núcleo de la célula infectada, tanto a través de la transcripción como de la replicación, es el complejo de la polimerasa viral. La RNA polimerasa dependiente de RNA del virus de la gripe está compuesta por tres subunidades, PB1, PB2 y PA que forman un heterotrímero con una masa molecular total de aproximadamente 250 kDa (**Fig. I3**). Experimentos de reconstitución de vRNPs y cRNPs activas *in vivo* a partir de cDNAs transfectados que expresan PB1, PB2 y PA, indican que las tres subunidades son necesarias tanto para la transcripción como para la replicación, ya que la omisión de cualquiera de ellas elimina la actividad (Perales & Ortin, 1997).

Las interacciones que establecen las tres subunidades dentro del complejo polimerasa se ha estudiado mediante múltiples aproximaciones de carácter bioquímico, genético y estructural (Digard et al., 1989; González et al., 1996; Obayashi et al., 2008; Perez & Donis, 1995; Sugiyama et al., 2009; Toyoda et al., 1996; Zurcher et al., 1996) (**Fig. I3-A**). Se ha podido determinar que PB1 funciona como subunidad central del complejo y que interacciona con PA, a través de su extremo amino terminal, y con PB2, mediante su extremo carboxilo terminal. También se han descrito interacciones entre las subunidades PB2-PA y PB1-PB2 que podrían





**Figura 13. La polimerasa del virus de la gripe.** (A) Representación esquemática de la polimerasa del virus de la gripe en la que se indican las regiones de interacción entre las subunidades mediante líneas punteadas y se muestran los dominios funcionales más importantes. También se representan las señales de localización nuclear (NLS) de cada subunidad. (B) La estructura tridimensional del complejo de la polimerasa de gripe determinada por microscopía electrónica. Las áreas coloreadas indican la localización de dominios específicos de las subunidades: naranja, región N-terminal de PB2; morado, región C-terminal de PA; verde, región C-terminal de PB1. Tomado de (Coloma et al., 2009).

tener funciones estructurales y/o en la regulación de la actividad de la polimerasa viral (Hemerka et al., 2009; Poole et al., 2004). Adicionalmente, la polimerasa del virus de la gripe interacciona con el RNA viral a través de la estructura de *panhandle* que forman los extremos 5' y 3' apareados (Hsu et al., 1987). Esta interacción con los extremos del RNA viral ayuda al mantenimiento de la estructura de la RNP.

La estructura tridimensional del complejo de la polimerasa de gripe ha sido determinada por microscopía electrónica sobre distintas muestras sometidas a tinción negativa, entre las que se incluyen polimerasa asociada a RNPs recombinantes (**Fig. 13-B**), polimerasa soluble sin RNA, y complejos polimerasa-vRNA generados por replicación *in vivo* (Area et al., 2004; Coloma et al., 2009; Resa-Infante et al., 2010; Torreira et al., 2007). Todos estos estudios muestran un complejo de estructura compacta que, no obstante, presenta una gran variabilidad conformacional dependiendo del contexto que se considera. Esto probablemente indique la alta capacidad de flexibilidad del complejo cuando interacciona con RNA y con otras proteínas virales y, presumiblemente, celulares. En el caso de la polimerasa asociada a RNP, la posición de dominios específicos de cada una de las tres proteínas se ha determinado por la reconstitución tridimensional de RNPs acomplejadas a anticuerpos monoclonales o con alguna etiqueta (Area et al., 2004).

Durante la infección, las tres subunidades de la polimerasa se acumulan en el núcleo de la célula

infectada. Cada una de las subunidades contiene una señal de localización nuclear (NLS) funcional y, por consiguiente, son capaces de ser importadas al núcleo de forma independiente (Akkina et al., 1987; Jones et al., 1986; Mukaigawa & Nayak, 1991; Nath & Nayak, 1990; Nieto et al., 1994; Smith et al., 1987). No obstante, varios estudios apuntan sobre la posibilidad de que la asociación de subunidades tenga lugar en el citoplasma previa a la importación nuclear. Uno de los modelos sugiere la formación del complejo heterodimérico PB1-PA en el citoplasma que sería transportado al núcleo a través de su asociación con RanBP5 (Deng et al., 2005; Neumann et al., 2004). Otro modelo, sin embargo, destaca la participación de Hsp90 en el transporte de los heterodímeros PB1-PB2 y PB1-PA (Naito et al., 2007). Recientemente, estudios de espectroscopía de fluorescencia han apoyado la hipótesis por la cual se formaría el heterodímero PB1-PA en el citoplasma, para después ser transportada al núcleo independientemente de la subunidad PB2 (Huet et al., 2010).

### 5.1.1 La subunidad PB1

La proteína PB1 es la más conservada evolutivamente y realiza la función de polimerización, catalizando la adición secuencial de nuevos nucleótidos a la cadena de RNA naciente (Braam et al., 1983; Ullman et al., 1981). Para desempeñar esta función, necesita unirse a los distintos RNAs virales (Cianci et al., 1995; Hagen et al., 1994; Huang et al., 1990; Perales et al.,

2000). En la secuencia de PB1 se distinguen los cinco motivos conservados característicos de las RNA polimerasas dependientes de RNA (Argos, 1988; Biswas & Nayak, 1994; Poch et al., 1990). Actúa como núcleo del complejo, interaccionando de manera independiente con PB2 y PA (Biswas & Nayak, 1996; Digard et al., 1989), y se une también a NP en el contexto de las RNPs virales (Biswas et al., 1998; Medcalf et al., 1999).

### 5.1.2 La subunidad PB2

La subunidad PB2 tiene un papel fundamental en la transcripción, ya que es la responsable del reconocimiento de la estructura *cap* tipo 1 de los pre-mRNAs de la célula huésped, que serán posteriormente cortados y utilizados como cebadores para la síntesis de los mRNAs virales (Blaas et al., 1982; Braam et al., 1983; Shi et al., 1996; Ulmanen et al., 1981). En 2008, se determinó el dominio responsable del reconocimiento y la unión de esta estructura, localizándolo entre los residuos 323 y 483, mediante la obtención de su estructura atómica unido a 7metil-GTP y su confirmación en posteriores ensayos de mutagénesis dirigida (Guilligay et al., 2008). La proteína PB2 también participa en la replicación viral, dado que mutantes puntuales en esta proteína dan lugar a alteraciones en la replicación pero no en la transcripción (Gastaminza et al., 2003).

### 5.1.3 La subunidad PA

La proteína PA es una fosfoproteína necesaria para la formación de una polimerasa activa (de la Luna et al., 1993; Perales & Ortín, 1997; Sanz-Ezquerro et al., 1998). Recientemente, se le ha atribuido actividad endonucleasa que, junto con su similitud estructural con las nucleasas de tipo II, sugiere un papel fundamental en el corte endonucleolítico de los pre-mRNAs celulares para generar los oligonucleótidos cebadores utilizados en la transcripción viral (Dias et al., 2009; Yuan et al., 2009). Por el contrario, atendiendo al fenotipo de mutantes termosensibles, la subunidad PA parece implicada fundamentalmente en el proceso de replicación (Mahy, 1983). Se ha demostrado que PA tiene actividad proteolítica (Hara et al., 2001; Sanz-Ezquerro et al., 1995; Sanz-Ezquerro et al., 1996), y su capacidad para inducir proteólisis ha sido relacionada con la síntesis de cRNA (Huarte et al., 2003; Perales et al., 2000) y con la degradación de la RNAP II durante la infección (Rodríguez et al., 2009; Rodríguez et al., 2007).

## 5.2 La Nucleoproteína o NP

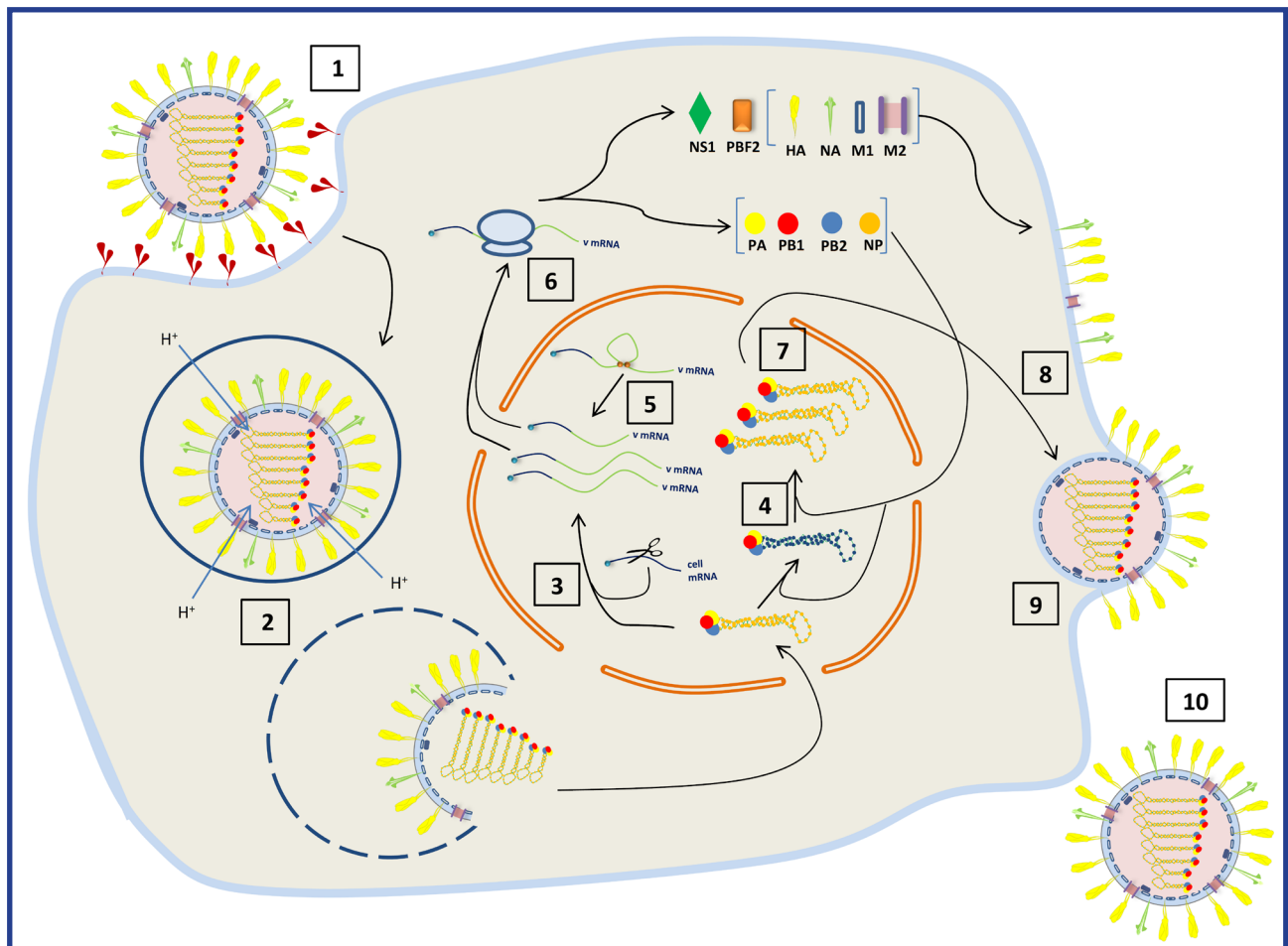
La nucleoproteína (NP) es el cuarto componente proteico de las RNPs y desempeña un papel esencial en la organización estructural de las mismas. Es necesaria para la transcripción y replicación del genoma viral, ya que la polimerasa no es capaz de utilizar un RNA desnudo como molde (Honda et al., 1988). Es una proteína básica que oligomeriza y une RNA de cadena sencilla de manera cooperativa e independiente de secuencia (Baudin et al., 1994; Kingsbury et al., 1987; Scholtissek & Becht, 1971; Yamanaka et al., 1990).

# EL CICLO DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE

## 1. Entrada de las Partículas Virales

La infección comienza con la interacción del virus con la célula diana (**Fig. 14, paso 1**). Este hecho suele ocurrir en las células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior de vertebrados por medio del ácido siálico presente en glicoproteínas y glicolípidos que constituye el receptor del virus (Weis et al., 1988). La espícula hemaglutinina HA, en forma de homotrímero, es la proteína viral que une el receptor de la célula (Skehel & Wiley, 2000). El receptor presenta dos configuraciones de glicoproteínas distintas dependiendo del tipo de enlace que se establece entre el ácido siálico y el carbohidrato. Los receptores pueden ser  $\alpha(2,3)$  y  $\alpha(2,6)$ , y son muy importantes para la especificidad en la unión entre las moléculas HA y la superficie celular de distintas especies. Los virus humanos reconocen la configuración  $\alpha(2,6)$ , mientras que los virus aviares y equinos reconocen  $\alpha(2,3)$ . Los de cerdo reconocen ambos y por ello pueden funcionar como buenos intermediarios en la generación de virus potencialmente muy peligrosos.

El virus entra en la célula por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor y, tras la formación de la vesícula endocítica, esta se fusiona con lisosomas dando lugar a endolisosomas. La acidez de estas vesículas favorece la entrada de protones al interior del virión a través del canal iónico formado por la proteína M2 (Helenius, 1992;



**Figura I4. Esquema del ciclo infeccioso del virus de la gripe. (A)** Representación esquemática de las diferentes etapas del ciclo de infección del virus de la gripe. Los mRNAs celulares se representan en azul, los mRNAs virales en verde, las cRNPs tienen puntos azules y las vRNPs puntos naranjas.

Pinto et al., 1992) (**Fig. I4, paso 2**), produciendo la liberación de las RNPs en el citoplasma (Skehel et al., 1995; Stegmann et al., 1987). Las vRNPs en el citoplasma deben de entrar en el núcleo donde la transcripción y replicación viral tienen lugar. Todas las proteínas constituyentes de las vRNPs tienen NLSs (**Nuclear Localization Signals**) que pueden asociarse a la maquinaria de importación nuclear de la célula y, por lo tanto, entrar en el núcleo (Boulo et al., 2007). Hasta la fecha no se sabe con certeza que NLS es la más importante para la entrada nuclear de las vRNPs, aunque sí se conoce que la importación ocurre a través de la vía dependiente de CRM1.

## 2. Transcripción y Replicación del RNA Viral

### 2.1 La transcripción

Para que tenga lugar la iniciación de la

transcripción o síntesis de mRNA, es necesario que la polimerasa esté uniendo ambos extremos del vRNA molde. En este proceso se utilizan como *primers* fragmentos de RNA con estructura 5' *cap* derivados del corte endonucleolítico de los pre-mRNAs producidos por la RNAP II (**Fig. I4, paso 3**). Por este motivo, la transcripción viral requiere de una transcripción celular activa, y drogas que inhiben la RNAP II, como la  $\alpha$ -amanitina o la actinomicina D inhiben también la transcripción viral (Rott & Scholtissek, 1970). Normalmente la transcripción se inicia con la adición de un residuo G al extremo 3' del *primer*, dirigido por el último residuo C en el molde (Plotch et al., 1981). El inicio de la transcripción requiere energía en forma de ATP, probablemente para que la polimerasa pueda realizar la transición entre la iniciación y la elongación de la transcripción (Klump et al., 1998). La elongación de los transcritos de mRNA continúa hasta que la polimerasa alcanza una secuencia corta, de entre 5 y 7 residuos de U situada a unos 15 nucleótidos del extremo del vRNA. La polimerasa copia reiteradamente esta secuencia, generándose una cola de poli A (Poon et al., 2000;

Poon et al., 1999).

Recientemente, estudios de trans-complementación genética, en los que se ha intentado rescatar el fenotipo de vRNPs generadas con un mutante de PB2 defectivo en transcripción, han permitido determinar que la síntesis del mRNA viral se realiza en *cis* por la polimerasa residente en la vRNP (Jorba et al., 2009). Este nuevo modelo es compatible con la síntesis de un único transcrito a partir de cada vRNP, al que la polimerasa podría permanecer unida modulando su procesamiento y exportación.

## 2.2 La replicación

La replicación se inicia con la síntesis de moléculas de cRNA, que son copias completas y complementarias del vRNA (**Fig. I4, paso 4**). La iniciación de la replicación tiene lugar en ausencia de cebador y el producto resultante tiene un extremo 5'-trifosfato. Además, la síntesis no se detiene en la secuencia de poliuridinas próxima al extremo 5' del vRNA, sino que continúa hasta el final del molde en un evento denominado anti-terminación (Hay et al., 1982). A partir de las cRNPs generadas, se producen nuevas vRNPs que serán encapsidadas en los viriones. Al contrario de lo que se ha observado para la transcripción viral, estudios de trans-complementación genética han permitido determinar que la replicación viral se realiza en *trans* por acción de una polimerasa soluble diferente a la residente en la RNP (Jorba et al., 2009).

La acumulación de mRNA viral y la subsecuente producción de proteína viral son seguidas por un cambio hacia actividad de replicación viral para la generación de nuevo vRNA progenie (Barrett et al., 1979; Hay et al., 1977). En esta situación el virus debe priorizar su ciclo replicativo en contraposición a la síntesis de mRNA viral y un número de estudios han identificado componentes claves que influyen en el cambio viral hacia replicación. Estos componentes incluyen: la estabilidad del cRNA, los niveles intracelulares de nucleótidos, la fracción soluble de NP y/o la polimerasa viral, y la degradación de la RNAP II (Jorba et al., 2009; Robb et al., 2009; Shapiro & Krug, 1988; Vreede et al., 2010; Vreede et al., 2008; Vreede et al., 2004). Adicionalmente, numerosos estudios han identificado factores celulares que interactúan con la polimerasa viral y/o las RNPs y que podrían estar modulando su actividad transcripcional o replicativa (Honda et al., 2007; Huarte et al., 2001; Jorba et al., 2008; Kawaguchi & Nagata, 2007; König et al., 2010; Mayer et al., 2007;

Momose et al., 2001; Momose et al., 1996; Momose et al., 2002; Naito et al., 2007; O'Neill et al., 1995; Shapira et al., 2009; Shimizu et al., 1994).

## 3. Procesamiento de los mRNAs y Síntesis de Proteínas Virales

Los productos de transcripción colineales del vRNA de los segmentos 7 y 8 codifican las proteínas M1 y NS1 respectivamente. Sin embargo, estos transcritos pueden ser procesados (**Fig I4, paso 5**), dando lugar a los mRNAs que codifican las proteínas M2 y NEP, respectivamente (Inglis et al., 1979; Inglis & Brown, 1981; Lamb & Choppin, 1983; Lamb et al., 1980; Lamb et al., 1981). Aunque es la maquinaria de *splicing* de la célula huésped la que elimina los intrones correspondientes, NS1 regula el procesamiento de estos mensajeros (Fortes et al., 1994; Fortes et al., 1995; Garaigorta & Ortin, 2007; Qiu et al., 1995).

Los mRNAs virales transcritos y procesados son transportados al citosol de la célula infectada de manera muy rápida y eficaz a través de la membrana nuclear (Shapiro et al., 1987). Por el momento, se desconoce la vía de exportación de los mRNAs virales, aunque se ha propuesto que la salida fuera del núcleo es independiente de la vía CRM1 (Amorim et al., 2007; Wang et al., 2008).

Ya en el citoplasma, los mRNAs virales se traducen más eficazmente que los mensajeros celulares (**Fig. I4, paso 6**) y, además, el virus ejerce una regulación negativa sobre estos últimos, reduciendo drásticamente su traducibilidad (Garfinkel & Katze, 1992; Katze & Krug, 1990; Krug et al., 1989; Yanguéz & Nieto, 2011). Esta regulación negativa en el citoplasma, junto con otros procesos principalmente nucleares, contribuye a un efecto global de inhibición de síntesis de las proteínas de la célula infectada, un fenómeno conocido como *shut-off* de proteínas celulares.

## 4. Morfogénesis: Ensamblaje de vRNPs y Liberación de Nuevas Partículas

En la fase tardía del ciclo de infección, entre las 5 y 6 horas post-infección, comienza la formación de nuevas partículas virales. Las vRNPs que van a formar parte de la progenie viral son transportadas al citosol a través del poro nuclear (**Fig. I4, paso 7**). En este proceso de transporte activo intervienen la proteína M1 (Martin & Helenius, 1991), la proteína NEP y la proteína NP de las vRNPs (Elton et al.,

2001; O'Neill et al., 1998). Una vez en el citoplasma, las vRNPs son transportadas por microfilamentos de actina hasta regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol denominadas *lipid rafts* (Ali et al., 2000; Avalos et al., 1997), a las que previamente se han anclado las proteínas HA, NA y M2 (Nayak et al., 2004; Scheiffele et al., 1999; Simpson-Holley et al., 2002) (**Fig. I4, paso 8**). Se ha propuesto que la proteína M1 es el principal organizador del ensamblaje de los nuevos viriones (Gomez-Puertas et al., 2000; Gomez-Puertas et al., 1999), aunque también se ha implicado a M2 en este proceso (Iwatsuki-Horimoto et al., 2006; McCown & Pekosz, 2006). El empaquetamiento del genoma viral requiere de la incorporación de las 8 vRNPs para generar viriones infectivos. Existen numerosas evidencias que apoyan un modelo de empaquetamiento dirigido de las 8 vRNPs, que se seleccionan y organizan siguiendo una distribución constante de 7 vRNPs en forma de anillo alrededor de una RNP central en el

interior de la partícula (Nayak et al., 2009; Noda et al., 2006). Esta selección podría estar dirigida por secuencias en *cis* presentes en los extremos 5' y 3' de todos los segmentos genómicos (Fujii et al., 2005; Fujii et al., 2003; Liang et al., 2005; Liang et al., 2008; Muramoto et al., 2006; Noton et al., 2007; Ozawa et al., 2009; Watanabe et al., 2003). Las partículas virales salen de la célula por gemación o *budding*, mecanismo mediante el cual el virus adquiere su envuelta lipídica (**Fig. I4, paso 9**). Recientemente se ha descrito la implicación del canal iónico viral M2 en las últimas etapas del *budding* viral a través de un proceso independiente de las proteínas ESCRT celulares (Rossman et al., 2010). Por último, la proteína NA procesa los receptores de ácido siálico que el virus ha arrastrado de la membrana celular, evitando la agregación y facilitando la dispersión de las partículas virales (Liu et al., 1995; Palese & Schulman, 1974) (**Fig. I4, paso 10**).



# CROMATINA CELULAR:

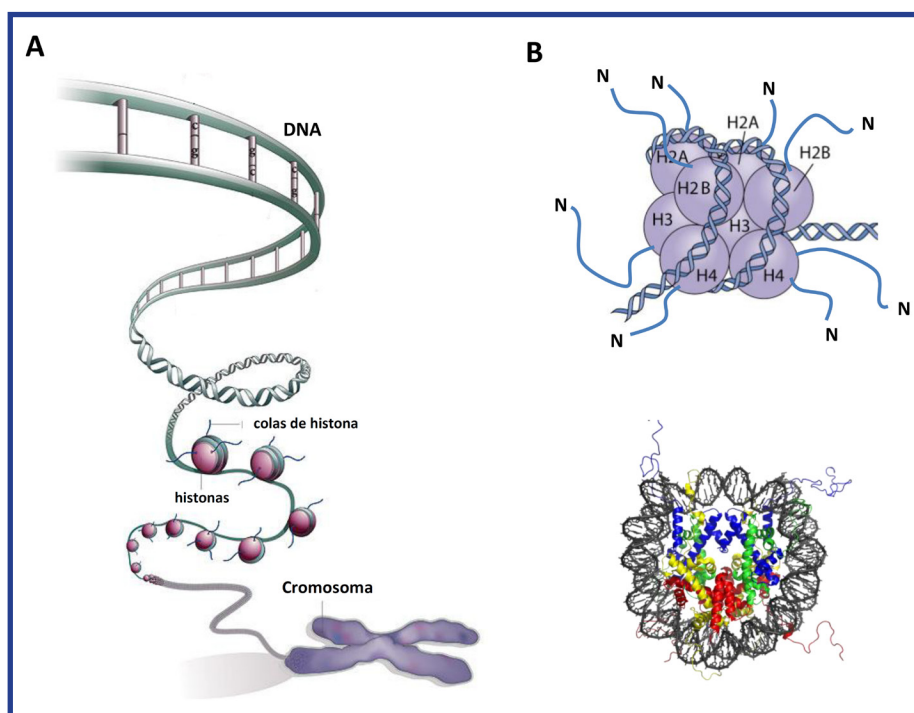
## REGULADOR DE LA

### TRANSCRIPCIÓN CELULAR

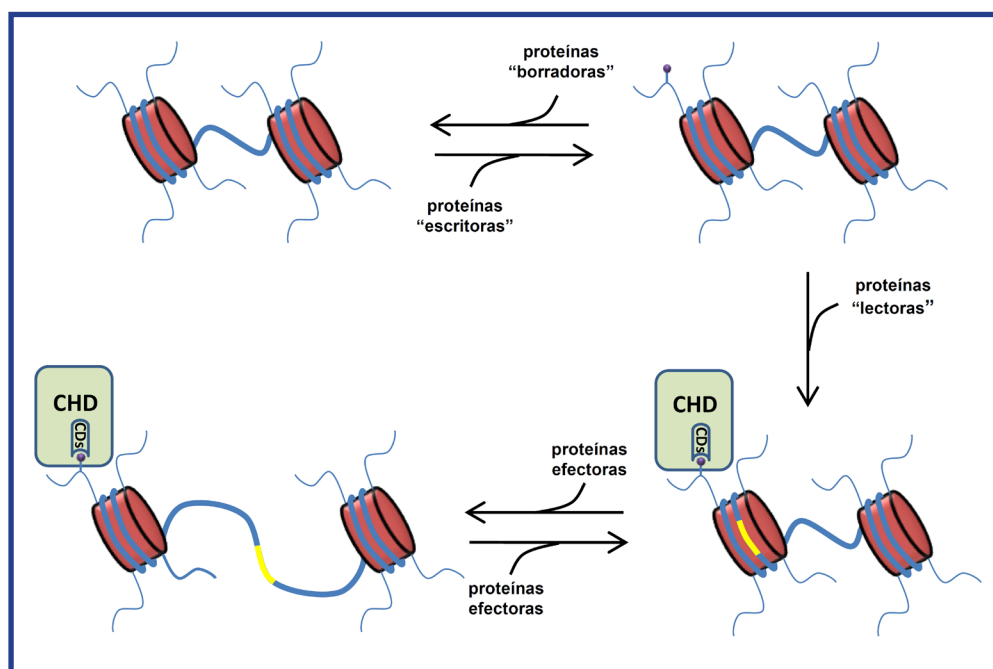
Las células eucariotas empaquetan su información genética en forma de cromatina, un enorme complejo nucleoproteico compuesto por el material genético primario, el DNA, y por una mezcla de proteínas estructurales y reguladoras (**Fig. I5-A**). El DNA eucariota se encuentra normalmente compactado en forma de fibras de cromatina de 30-nm (Langmore & Schutt, 1980). Estudios estructurales sugieren que la fibra de 30-nm se compone de filas de nucleosomas dispuestos en tándem y plegados en una estructura condensada de orden mayor. Estas estructuras impiden interacciones entre el DNA almacenado y factores

que interaccionan y reconocen el DNA (Beato & Eisefeld, 1997). En esta situación se hace necesaria la remodelación de la cromatina a través de un mecanismo que es imprescindible para que tengan lugar procesos biológicos de vital importancia para la célula (Adams & Workman, 1993).

La influencia que la cromatina tiene en el proceso de transcripción celular quedó reflejada inicialmente con los descubrimientos que mostraron como los nucleosomas impiden la transcripción *in vitro* (Knezetic & Luse, 1986; Lorch et al., 1987), y como la delección de histonas o de sus colas producía efectos específicos en la expresión genética *in vivo* (Han & Grunstein, 1988; Kayne et al., 1988). Por razones de simplificación, en esta comunicación nos centraremos mayormente en la importancia que la regulación de la cromatina ejerce sobre el proceso de transcripción celular.



**Figura I5. Cromosomas, nucleosomas e histonas.** (A) Representación esquemática mostrando distintos niveles de compactación del DNA genómico dentro de un cromosoma metafásico. Adaptado de (Qiu, 2006). (B) En la parte superior se muestra una representación gráfica de un nucleosoma con las 8 histonas, cada una con sus extremos o colas amino terminales. También se muestra el DNA bicatenario que rodea el octámero de histonas en un total de 1.7 vueltas. En la parte inferior se muestra la estructura tridimensional de un nucleosoma visto frontalmente siguiendo el eje de empaquetamiento del DNA (de color gris). Los colores de las histonas que rodean el DNA bicatenario son: H3: azul; H4: verde; H2A: amarillo; H2B: rojo. Nótese las colas de histonas que se extienden fuera del nucleosoma. Tomado de (Luger et al., 1997).



**Figura I6. Mecanismos de regulación de la cromatina celular.** Representación gráfica mostrando la interrelación entre dos de los mecanismos de regulación de la cromatina celular: la modificación post-traduccional de histonas (parte superior) y la remodelación de cromatina (parte inferior). Las proteínas "escritoras" y "borradoras" son las enzimas que añaden o quitan modificaciones de histonas (representadas con un línea y un punto morado en la cola de histona), respectivamente. La proteína "lectora" y "efectora" incluida en este gráfico corresponde a una misma proteína representada como un remodelador de cromatina dependiente de ATP de la familia CHD. Miembros de ésta familia pueden reconocer modificaciones de histonas a través de sus cromodominios (CDs) y movilizar los nucleosomas para permitir la accesibilidad o la oclusión del DNA.

## 1. El Nucleosoma y las Histonas

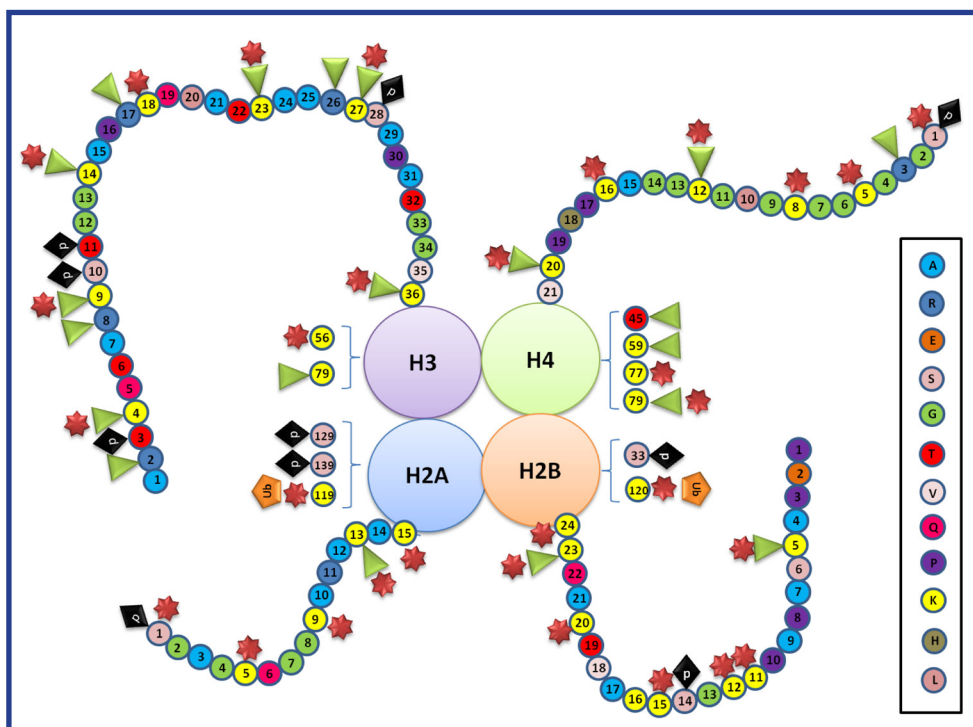
La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, consistente en 146 pares de bases de DNA alrededor de un octámero que contiene 2 copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Kornberg & Thomas, 1974) (**Fig. I5-B**). H1, también conocida como "histona de unión" (*linker histone*), cierra el DNA en los puntos de entrada y salida del nucleosoma y ayuda a conseguir mayores grados de condensación.

Las histonas son proteínas básicas altamente conservadas, que estructuralmente presentan dos dominios claramente distinguibles (Luger et al., 1997). El dominio globular, denominado "núcleo" de histona, es la estructura sobre la cual se enrolla el DNA, principalmente a través de interacciones electrostáticas entre los residuos cargados positivamente de las histonas y los fosfatos del DNA cargados negativamente. El otro dominio es el formado por los últimos 25-40 aminoácidos del extremo amino terminal, también llamado "cola" de histona, que se encuentra muy conservado evolutivamente y se extiende hacia fuera del núcleo de histona (**Fig. I5-B**). Estas colas de histonas son estructuras altamente flexibles y

móviles (Schroth et al., 1990), pueden interactuar con DNA y/u otras proteínas y también pueden ser modificadas covalentemente por múltiples tipos de modificaciones post-traduccionales.

## 2. Mecanismos de Regulación de la Cromatina Celular Implicados en Transcripción Celular

Desde que la estructura de la cromatina fue reconocida como una unidad repetitiva de histonas que engloban el DNA genómico, se ha especulado sobre la posibilidad de que su función se extienda más allá de la compactación y el almacenamiento del DNA. Desde entonces, la investigación sobre cromatina ha crecido exponencialmente, haciendo cada vez más evidente el profundo y ubicuo efecto que la estructura de la cromatina ejerce sobre la mayoría de los procesos biológicos dependientes de DNA, como transcripción, recombinación, reparación de DNA, replicación, etc. Todas estas actividades, vitales para el correcto funcionamiento de la célula, son posibles gracias a diversos mecanismos que la célula ha desarrollado para manipular la estructura de la cromatina y regular el acceso al DNA. Entre estos mecanismos se incluyen la remodelación de cromatina dependiente de ATP y la modificación covalente de histonas (**Fig. I6**), cuyos mecanismos



**Figura I7. Modificaciones post-traduccionales de histonas.** Representación gráfica mostrando las modificaciones de histonas más importantes. Los dominios globulares de las histonas se representan en el centro como círculos sólidos con sus colas amino terminales extendiéndose fuera del núcleo. Los residuos de amino ácidos en las colas han sido enumerados atendiendo a sus posiciones con respecto al extremo amino terminal. Las modificaciones en los residuos de las colas y de los dominios globulares han sido anotados utilizando los siguientes iconos: metilación representada con un triángulo verde; acetilación con asterisco rojo; fosforilación con rombo negro; ubiquitinación con un pentágono naranja. El código de color utilizado para los diferentes amino ácidos se indica en el lado derecho. Las abreviaciones utilizadas son de una única letra y corresponden a los establecidos como estándar (A: alanina; R: arginina; E: ácido glutámico; Q: glutamina; G: glicina; H: histidina; L: leucina; K: lisina; P: prolina; S: serina; T: treonina; V: valina). Adaptado de (Jayani et al., 2010).

de acción se detallaran en los siguientes apartados.

## 2.1 Modificaciones de histonas

Se ha demostrado que las colas de histonas son sitios de interacción para diversas clases de maquinarias enzimáticas capaces de modificar covalentemente las colas de histonas. Estas modificaciones incluyen: la metilación en residuos de arginina (R); la metilación, acetilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, y sumoilación de lisinas (K); y la fosforilación de serinas y treoninas (**Fig. I7**). Las modificaciones que se encuentran asociadas con transcripción activa, como acetilación de la histona 3 y la histona 4 (H3Ac y H4Ac), y di- o trimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me2 y H3K4me3), son comúnmente anotadas como modificaciones de eucromatina (región de la cromatina asociada a la transcripción activa de genes). Las que se localizan en genes y regiones inactivas, como H3K9me y H3K27me, habitualmente

están considerados como modificaciones de heterocromatina (región históricamente relacionada con bajos niveles de transcripción). La mayoría de estas modificaciones se distribuyen con un patrón de localización específico dentro de la región *upstream*, promotor, y extremos 5' y 3' de la fase abierta de lectura ORF (*Open Reading Frame*) (**Fig I8**). Es más, la distribución de las modificaciones en el ORF puede variar de una manera altamente regulada y acorde con los múltiples cambios que ocurren en un proceso tan complejo y dinámico como es la transcripción (Berger, 2007; Jenuwein & Allis, 2001).

El alto número de proteínas efectoras con capacidad de reconocer modificaciones de histona y, por lo tanto, de asociarse a cromatina (también denominadas proteínas "lectoras" de marcas epigenéticas) y promover su remodelación, sugiere que la función más importante de las modificaciones de histonas no es la alteración directa del nucleosoma o de la estructura de cromatina, sino la modulación de interacciones proteína-proteína que, a su vez, influye en la estructura de la cromatina y



la accesibilidad del DNA. En conjunto, se conocen más de 35 sitios en las regiones amino y carboxilo terminal de las 4 histonas centrales que están sujetos a modificación covalente (**Fig. 17**). ¿Porque existen tantas modificaciones? Nuestro conocimiento cada vez mayor sobre las diversas modificaciones de las histonas y de la compleja interrelación entre distintas modificaciones, ha llevado a sugerir la existencia de un “código de histonas” (Jenuwein & Allis, 2001; Strahl & Allis, 2000), mediante el cual el patrón de modificaciones especifica qué regiones del genoma se expresan en un momento particular e impone otros aspectos de la biología del genoma, como la reparación de sitios dañados y la coordinación de la replicación del genoma con el ciclo celular. A nivel de transcripción celular, el código más sencillo concebible sería uno binario que estableciera una relación entre las modificaciones de histonas y la activación o represión génica. En el siguiente apartado se anotaran ejemplos de modificaciones con clara tendencia a ser positivos o negativos transcripcionalmente y que apoyarían la existencia de éste tipo de código. No obstante, la realidad muestra una relación mucho más compleja, ya que se han descrito modificaciones que actúan tanto en activación como en represión transcripcional o, incluso, modificaciones que se han relacionado no solo con transcripción, sino también con reparación de daño en DNA u otros procesos biológicos.

traduccional, ya que puede ocurrir tanto en residuos de lisinas como en residuos de argininas. Además, y al contrario de lo que ocurre con la acetilación y fosforilación, que presentan una correlación con transcripción activa, las metilaciones pueden ser positivas o negativas en términos de expresión transcripcional, dependiendo del residuo de histona modificado. El residuo de lisina de histonas puede ser metilado en el nitrógeno épsilon y puede ocurrir en las formas mono-, di-, o trimetiladas, aportando mayor complejidad a éste tipo de modificación.

De los muchos sitios de metilación conocidos, 6 han sido bien caracterizados: 5 en H3 (K4, K9, K27, K36 y K79) y uno en H4 (K20). Mientras que las metilaciones en H3K4, H3K36, y H3K79 han sido ligadas a activación transcripcional, el resto lo han sido a represión (**Fig. 18**). Como se explicó más arriba, una de las principales funciones atribuidas a las modificaciones de histonas es la de servir como plataformas de interacción con otras proteínas (denominadas “lectoras” de marcas epigenéticas) o complejos de proteínas implicados en la modificación de la cromatina. Estudios recientes han identificado al menos 6 motivos proteicos capaces de interaccionar específicamente con residuos de lisina metiladas: el Cromodominio, el dominio Tudor, el dominio de repetición WD40, el dominio PWWP, el dominio MBT y los PHD *fingers* (revisión en (Yap & Zhou, 2010)).

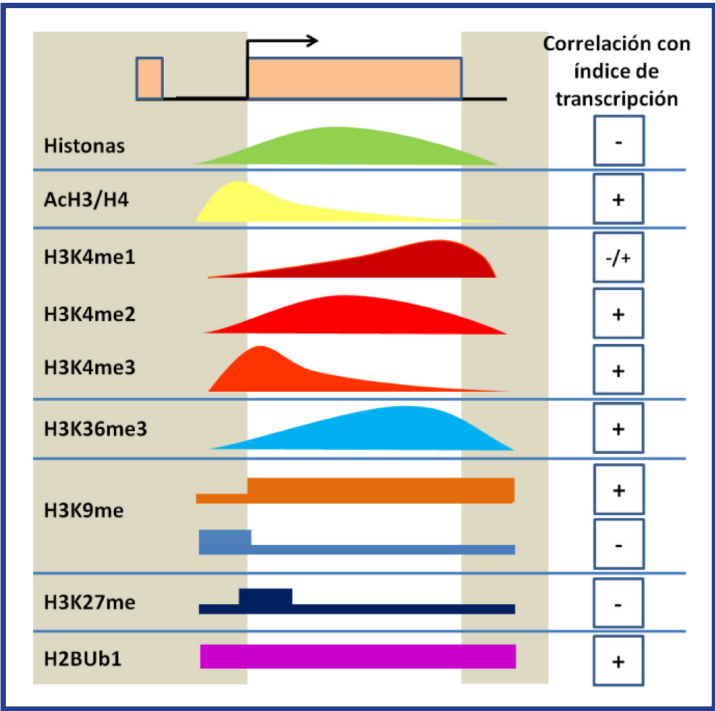
2.1.1 Metilación de histonas

La modificación de histonas por metilación es más compleja que cualquier otra modificación post-

2.1.1.1 Metilación de lisinas de histona y activación transcripcional

Los principales residuos de lisina metilados

**Figura 18. Distribución a nivel genómico de modificaciones de histonas relevantes en el proceso de transcripción celular.** Representación gráfica de la distribución, en relación a un gen arbitrario con promotor y ORF, de histonas y varias de las modificaciones más importantes a nivel transcripcional. Modificaciones con curvas indican un patrón de distribución que ha sido determinado a través de ensayos de amplio espectro (*genome-wide*). Modificaciones con cuadrados indican una distribución obtenida a partir de datos procedentes de un número reducido de ensayos experimentales. Adaptado de (Li et al., 2007).



que han sido asociados positivamente con actividad génica incluyen K4, K36 y K79 de la histona 3. La metilación en estos 3 residuos parece estar directamente acoplado al proceso de transcripción. En el caso de la metilación en H3K4 y H3K36, las enzimas responsables de ambas modificaciones se asocian con la RNAP II durante el proceso de elongación, resultando en la metilación de las histonas en las regiones codificantes.

El uso de anticuerpos específicos en inmunoprecipitaciones de cromatina acoplados a la tecnología de microarray génico o secuenciación masiva (ChIP on CHIP y ChIP-seq, respectivamente) han revolucionado nuestra capacidad de monitorizar la incidencia global no solo de las modificaciones de histonas, sino también de las proteínas “lectoras” que se asocian a dichas modificaciones (Schones & Zhao, 2008). En años recientes se han efectuado numerosos análisis de estas características y los resultados han mostrado claramente que la distribución de las modificaciones no es uniforme (Barski et al., 2007; Bernstein et al., 2005; Liu et al., 2005; Pokholok et al., 2005) (**Fig. 18**). En el caso concreto de la **metilación de H3K4**, se ha observado una correlación general entre los distintos estados de metilación, su localización genómica, y el nivel de expresión génica. La visión general actual establece que se dan niveles muy altos de H3K4 trimetilado alrededor del sitio de inicio de la transcripción en prácticamente todos los genes activos, y que existe una fuerte correlación positiva entre esta modificación, la frecuencia de transcripción y la ocupación de la RNA polimerasa II activa. La distribución del resto de formas metiladas del residuo H3K4 muestra un patrón distintivo en el que el enriquecimiento de la forma dimetilada es mayor hacia la mitad de la pauta de lectura abierta (ORF) de un gen activo, y el de la forma monometilada ocurre hacia el extremo 3' del ORF. Se cree que la específica y detallada distribución de las distintas formas metiladas de H3K4 a lo largo de un gen activo (formando un gradiente de metilación), es consecuencia de un reclutamiento ordenado del complejo responsable de la metilación (Set1 en levaduras y el homólogo SET1/MLL/ALL1/HRX en humanos) a través de su asociación con la RNAP II de elongación. La acumulación de H3K4me3 en el extremo 5' del ORF podría servir como una señal crítica para definir el inicio de la transcripción y la frecuencia con la que RNAP II atraviesa esa zona.

Sin embargo, todavía se desconoce cuál es la función específica de la metilación H3K4. Estudios recientes parecen indicar que parte de su función vendría dada por su capacidad de interaccionar y reclutar complejos remodeladores de cromatina. Por ejemplo, los factores remodeladores

de cromatina NURF y los complejos de modificación de histonas (hTip60, mSIN3/HDAC, yNuA3, etc.) contienen dominios PHD *finger* que pueden reconocer específicamente H3K4 metilada y, por lo tanto, reclutar sus respectivos complejos para activar o reprimir la transcripción (Zhang, 2006). También se sabe que el factor Chd1, factor remodelador de cromatina relacionado con elongación transcripcional, reconoce H3K4 metilado (Flanagan et al., 2005; Pray-Grant et al., 2005; Sims et al., 2007). Futuros estudios dirigidos a conocer la influencia de estos complejos asociados a H3K4 en la elongación transcripcional, proporcionarán información para esclarecer la función de de la marca H3K4 metilada.

### 2.1.1.2 Metilación de lisinas de histona y represión transcripcional

Los mecanismos de silenciamiento génico basados en cromatina dan como resultado la formación de estructuras especializadas de orden superior que aseguran un patrón de expresión restringido en el tiempo y en el espacio. Una de estas estructuras es la heterocromatina que permanece altamente condensada durante el ciclo celular y se encuentra normalmente asociada a centrómeros y telómeros, dominios de cromatina que contienen un alto porcentaje de DNA repetitivo. Una importante función de esta estructura es la de reprimir la recombinación aberrante entre las repeticiones de DNA y, de esta forma, preservar la estabilidad genómica (Peng & Karpen, 2008). Molecularmente, una de las características de la heterocromatina es la acumulación de altos niveles de varias formas metiladas (en los residuos H3K9, H3K27, y H4K20). El reclutamiento de PRC2 (complejo de represión polycomb 2) a **H3K27me** está implicado en el mantenimiento del cromosoma X en estado inactivado (Plath et al., 2003), mientras que el reclutamiento de HP1 (proteína de heterocromatin 1) a **H3K9me** juega una importante función en el mantenimiento de la heterocromatina pericentromérica (Kwon & Workman, 2008).

La metilación en H3K9 es la modificación de histona más estudiada hasta el momento, principalmente debido a que la enzima responsable, SUV39H1, fue la primera metil-transferasa de residuos de lisina identificada (Rea et al., 2000). El mecanismo por el cual la metilación de H3K9 regula la formación de heterocromatina pericentromérica se ha determinado a través de estudios realizados en levaduras de fisión y en humanos donde las estructuras de heterocromatina se encuentran razonablemente conservadas (revisado en (Grewal & Jia, 2007)). Para el establecimiento de la heterocromatina se ha determinado el requerimiento

del efecto cooperativo de dos proteínas: SUV39H (homólogo del factor Clr4 de levadura) y el factor de unión a H3K9me3, HP1 (homólogo de Swi6 de levadura). Un posible modelo de cómo actuarían estas proteínas establece que la metilación de H3K9 mediada por SUV39H crea una plataforma de unión para HP1 a través de su cromodominio. Una vez que HP1 se une, puede expandirse por nucleosomas adyacentes por medio de su asociación con SUV39H, que metila más histonas vecinas.

La habilidad de la heterocromatina para propagarse lejos de su sitio original de nucleación y la identificación en estas regiones de numerosas proteínas efectoras implicadas en diferentes procesos relacionados con la cromatina, han llevado a proponer la hipótesis de que la heterocromatina pudiera funcionar como una versátil plataforma de reclutamiento de diversos factores implicados en muchos procesos celulares (Grewal & Jia, 2007; Cam et al., 2009). Esta hipótesis desafiaría la antigua percepción sobre ésta estructura que establece la heterocromatina como la forma definitiva de represión en la célula.

La metilación en H3K9 también funciona en la represión transcripcional de genes activos en la eucromatina. Ensayos por ChIP han detectado la acumulación de este marcador en el promotor de genes de mamífero silenciados. La represión resultante, al contrario de lo que pasa con el silenciamiento en heterocromatina, se consigue gracias a la ocupación restringida de HP1 a tan solo uno o varios nucleosomas alrededor del sitio de iniciación, a pesar de que H3K9 metilada ocurre en otras partes del promotor. Esta restricción de HP1 limitada a las regiones promotoras de genes de eucromatina, y la limitación en el proceso de expansión, sugieren un mecanismo de acción distinto para HP1 en relación al que ocurre en heterocromatina.

### 2.1.2 Demetilación de residuos de lisina

Hasta hace relativamente poco tiempo no estaba claro si la demetilación de lisinas en histonas tenía lugar en la célula. La búsqueda de enzimas con esas características no ha sido productiva hasta recientemente, y existen evidencias que muestran una gran estabilidad en grupos metilo en regiones de heterocromatina. El descubrimiento de la proteína LSD1 cambió toda esa percepción (Shi et al., 2004). LSD1 es una enzima “borradora” que retira grupos metilo específicamente del residuo H3K4, y está implicada en represión. Desde el descubrimiento de LSD1 se han identificado un gran número de

demetilasas de histonas que parecen jugar papeles importantes en la expresión génica. Las enzimas demetilasas de lisinas pueden clasificarse en dos grandes grupos: La clase LSD1/BHC110 (que retira grupos metilo de H3K4me1 y me2) y la clase Jumonji (que retira grupos metilo de H3K4me2 y me3, H3K9me2 y me3, y H3K36me2 y me3) (Klose et al., 2006; Shi et al., 2004).

### 2.2 Remodeladores de cromatina dependientes de ATP

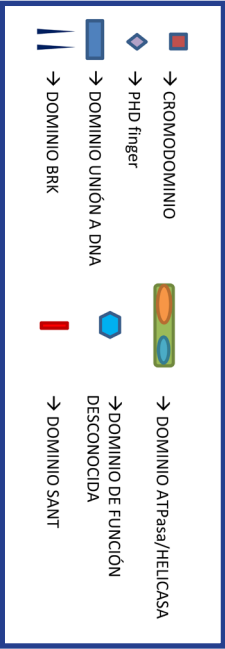
Los complejos remodeladores de cromatina son complejos multiproteicos que utilizan ATP para deshacer contactos entre el nucleosoma y el DNA, desplazar nucleosomas a lo largo del DNA y retirar o cambiar nucleosomas. De esta forma hacen disponible el DNA y/o la cromatina a proteínas que necesitan acceder directamente a DNA o a histonas durante diversos procesos celulares (Becker & Hörz, 2002) (**Fig. 16**). La función esencial de éstas enzimas queda reflejada en el hecho de que muchas de ellas son requeridas para diversos aspectos del desarrollo embrionario incluyendo pluripotencia, desarrollo cardíaco, morfogénesis dendrítica y auto-renovación de células madre neuronales. En adultos, la delección o mutación de éstas proteínas frecuentemente va asociado a apoptosis o tumorigenesis como consecuencia de la desregulación en el control del ciclo celular.

Los primeros complejos remodeladores de cromatina fueron identificados en estudios genéticos en levadura como mutaciones que alteraban la transcripción de genes que son inducidos en respuesta a señales extracelulares (Winston & Carlson, 1992). Posteriormente, estas cepas mutantes fueron llamadas Swi/Snf ya que afectaban la expresión de los genes *HO* y *SUC2*, que son importantes en el cambio de tipo de apareamiento y la fermentación de sacarosa (**SW**itching defective y **Suc**rose **NonFer**menting), respectivamente. Las mutaciones *swi2* y *snf2* podían ser suprimidas por mutaciones en las histonas H2A y H2B, y los mutantes mostraron una sensibilidad a nucleasa alterada en el gen *suc2*. Varios estudios han indicado como las proteínas SWI/SNF son capaces de activar la transcripción mediante la liberación de los efectos represivos de la cromatina (Laurent et al., 1991; Peterson & Herskowitz, 1992).

Estudios de homología de secuencia han permitido clasificar las proteínas remodeladoras de cromatina en cuatro familias: la familia SWI/SNF, INO80/SWR1, ISWI y CHD. Estas enzimas muestran afinidad por el nucleosoma y actividad ATPasa

Miembros	Tamaño (aas)	Domínios característicos	Capacidad de unión a H3	Función en mamíferos
<div> </div> <div> <b>Subfamilia CHD I</b> </div>				
CHD1	1709	Dominio Unión a DNA	H3K4me	Esencial en pluripotencia de células ES; implicado en la regulación de elongación transcripcional y splicing de pre-mRNA.
CHD2	1828	Dominio Unión a DNA	H3K4me	Ratones mutantes homocigóticos presentan retraso en crecimiento y letalidad perinatal.
CHD3 (Mi-2a)	2000	PHD fingers	H3 no mod.	Presente en complejo NuRD de represión asociado a deacetilasas; implicado en represión transcripcional; Inhibidor de la diferenciación de células T.
CHD4 (Mi-2b)	1912	PHD fingers	H3 no mod.	Presente en complejo NuRD de represión; implicado en reparación de daño a DNA; promueve la expresión de CD4 en desarrollo de células T.
CHD5	1954	PHD fingers	?	Frecuentemente delecionado en neuroblastomas humanos.
CHD6	2715	SANT	?	Interacciona con Nrf2 implicado en la regulación de la expresión de genes de respuesta a stress oxidativo; implicado en proliferación celular y radiosensibilidad; colocaliza con la RNAP II.
CHD7	2997	SANT/BRK	H3K4me/H3K9me	Mutado en el síndrome de CHARGE en humanos.
CHD8	2581	BRK	H3K4me	Implicado en transcripción mediada por respuesta a estrógeno o por $\beta$ -catenina; suprime la apoptosis mediada por p53.
CHD9	2897	BRK	?	Implicado en diferenciación de células osteogénicas.
<div> </div> <div> <b>Subfamilia CHD II</b> </div>				
<div> </div> <div> <b>Subfamilia CHD III</b> </div>				

**Tabla I1. Familia CHD de remodeladores de cromatina dependientes de ATP.** Información estructural y funcional de los miembros constituyentes de la familia de remodeladores de cromatina CHD. Células ES: células madre embrionarias; complejo NuRD: complejo que contiene CHD3 y/o CHD4 e implicado en remodelación y deacetilación de nucleosomas.





dependiente de nucleosoma y DNA *in vitro*. La mayoría de los remodeladores de cromatina forman complejos grandes con múltiples subunidades. Las proteínas acompañantes en este complejo presentan comúnmente dominios de interacción que pueden regular directamente la actividad enzimática del complejo, facilitar la unión a factores de transcripción y a otras enzimas remodeladoras de cromatina, y dirigir el complejo a DNA y/o a histonas modificadas. Es probable que sean estas subunidades adicionales las que establezcan especificidad funcional entre ATPasas con alto grado de similitud.

### 2.2.1 Familia CHD de remodeladores de cromatina dependientes de ATP

Las ATPasas de la familia CHD (*Chromodomain-Helicase/ATPase DNA-binding*) se caracterizan por tener un tándem de cromodominios en el extremo amino terminal, además del dominio ATPasa conservado ya mencionado. Se conocen 9 miembros dentro de esta familia que han sido divididos en 3 subfamilias basándose en la similitud de los dominios estructurales que presentan (**Tabla I1**). Los miembros CHD1 y CHD2 se distinguen por presentar un dominio de unión a DNA en el extremo carboxilo, CHD3- CHD5 tienen PHD *fingers* emparejados en el extremo amino terminal, y CHD6-9 tienen otros dominios funcionales en su extremo carboxilo-terminal. En la **Tabla I1** se anotan diversas características estructurales y funcionales de cada uno de los 9 miembros de la familia CHD. En ésta tesis solo se detallaran datos concretos de los miembros de la subfamilia III.

#### 2.2.1.1 Subfamilia III: CHD6-CHD9 y KIS-L

La tercera subfamilia contiene las proteínas CHD6-9. Son proteínas de reciente caracterización y presentan varios dominios adicionales además de los cromodominios y el dominio ATPasa comunes (**Tabla I1**). Existe un homólogo en *Drosophila*, Kismet-L (KIS-L), que pertenece al grupo trithorax. **KIS-L** se ha visto asociado con cromatina transcripcionalmente activa, facilita la elongación mediada por la RNA polimerasa II, impide la acumulación de metilación en H3K27 y, por consiguiente, antagoniza la represión mediada por proteínas Polycomb (Srinivasan et al., 2005; Srinivasan et al., 2008).

Las proteínas CHD7, CHD8, CHD9 y KIS-L comparten en el extremo carboxilo terminal una pareja de dominios BRK (**Brahma** y **Kismet**; también llamado TCH), cuya función por el momento es desconocida (Allen et al., 2007; Doerks et al., 2002). Mutaciones en **CHD7** están asociadas

en humanos a más del 60 % de los casos del síndrome de CHARGE, patología caracterizada por la manifestación de múltiples anomalías congénitas (Vissers et al., 2004).

**CHD8** está implicada en la modulación de varias vías de señalización: inhibe apoptosis mediada por p53 durante la embriogénesis temprana a través del reclutamiento de la histona H1 (Nishiyama et al., 2009), modula negativamente la expresión de genes activados por  $\beta$ -catenina (Thompson et al., 2008), y está implicada en la proliferación inducida por estrógeno a través de la modulación positiva del gen de la ciclina E2 (Caldon et al., 2009; Rodríguez-Paredes et al., 2009). A nivel transcripcional, CHD8 funciona como modulador negativo y positivo de la transcripción, y la interacción descrita con la RNAP II de elongación podría ser importante para su mecanismo de acción (Rodríguez-Paredes et al., 2009).

**CHD9** parece jugar un papel importante en la regulación de la transcripción durante la diferenciación de células osteogénicas (Marom et al., 2006; Shur & Benayahu, 2005). Además, se ha identificado como coactivador transcripcional en respuesta a proliferadores de peroxisoma que forma parte de un complejo multiproteico junto al receptor nuclear PPARalpha (*Peroxisome Proliferator. Activated Receptor alpha*) (Surapureddi et al., 2006).

**CHD6**, proteína objeto de esta Tesis, contiene en su extremo carboxilo terminal, al igual que CHD7, un dominio SANT (**Swi3**, **Ada2**, **N-CorR**, **TRIIIB**) (**Tabla I1**) comúnmente presente en proteínas reguladoras transcripcionales donde parece funcionar como modulo de interacción a colas de histonas (Aasland et al., 1996; Boyer et al., 2002; Boyer et al., 2004). Funcionalmente, en nuestro laboratorio hemos observado que CHD6 forma un complejo de alto peso molecular (entre 2 y 3 MDa) y está presente exclusivamente en el núcleo celular, donde colocaliza con las formas hipo- e hiperfosforiladas de la RNA polimerasa II (Lutz et al., 2006). Además, observamos que CHD6 es una enzima funcional al demostrar que exhibe actividad ATPasa dependiente de DNA. También hemos demostrado que ratones sin el exón 12 de CHD6 (que codifica el motivo I del dominio ATPasa) presentan un fenotipo atáxico (Lathrop et al., 2010). Por otra parte, se ha descrito la interacción de CHD6 con el dominio Neh3 de NRF2, factor de transcripción crítico en el mantenimiento de la homeostasis oxidativa celular (Nioi et al., 2005). También se ha podido observar que CHD6 se induce en células linfoblastoides humanas sometidas a radiación gamma de baja dosis y, por lo tanto, podría estar implicado en proliferación celular y radiosensibilidad

(Wang et al., 2006).

### 2.2.1.2 Caracterización de la familia CHD como “lectores” de residuos de lisina metilados

Para la regulación transcripcional epigenética es vital el reconocimiento de la cromatina, en sus estados activo e inactivo, por parte de proteínas que directa o indirectamente inducen cambios en la transcripción (ver **Fig. I6**). En los últimos años se han identificado varios dominios evolutivamente conservados capaces de interaccionar con modificaciones de histona específicas asociadas con un determinado estado transcripcional. Uno de estos motivos es el cromodominio (CD) (Paro & Hogness, 1991), módulo que reconoce histonas metiladas en residuos de lisina. El CD pertenece a la super-familia Royal que incluye otros dominios de estructura relacionada como son Tudor, chromo-, PWWP y Agenet (Maurer-Stroh et al., 2003). Todos descienden de una estructura ancestral común con habilidad, conservada evolutivamente, para reconocer ligandos metilados.

La familia CHD de cromodominios son únicas en la super-familia Royal al presentar 2 cromodominios situados en tándem. El análisis filogenético de las distintas secuencias de CDs en la familia CHD permite la división en subfamilias que coinciden con las subfamilias CHD mencionadas anteriormente (Yap & Zhou, 2011). En la subfamilia I, CHD1 se encuentra estructuralmente mejor caracterizado que los otros 8 miembros CHD. Se ha

descrito la interacción de su tándem de CDs con un único motivo H3K4me (Flanagan et al., 2005), marca epigenética implicada en activación transcripcional. Estos estudios determinaron que la pareja de cromodominios podría trabajar cooperativamente para el reconocimiento de histonas metiladas (Flanagan et al., 2007; Flanagan et al., 2005). La segunda subfamilia de cromodominios CHD son los que están presentes en CHD3, 4 y 5. Los CDs de los homólogos de CHD3 y CHD4 en *Drosophila* (también llamados Mi-2 $\alpha$  y Mi-2 $\beta$ , respectivamente), parecen tener una mayor afinidad por DNA y no necesitan unión a colas de histona para asociarse a cromatina (Bouazoune et al., 2002). Ninguna pareja de cromodominios de estas proteínas parece tener los residuos que se cree son importantes en la unión a lisina metilada (Sims et al., 2005). No obstante, ensayos de *pull-down* con colas sintéticas de histona han determinado su asociación preferente a colas de histona 3 no modificadas (Nishioka et al., 2002; Zegerman et al., 2002). Los CDs de la subfamilia III (CHD6-9) unen H3K4me como ha sido observado a través de ensayos de *pull-down in vitro* utilizando colas sintéticas de histona modificadas e incubadas con CHD7 purificada (Schnetz et al., 2009; Takada et al., 2007), y con los cromodominios purificados de CHD8 (Rodríguez-Paredes et al., 2009). No obstante, también se ha visto asociación de CHD7 con H3K9me3 (Takada et al., 2007), lo que sugiere que los miembros de la subfamilia CHD6-9 podrían ser capaces de unir tanto marcas de activación como de represión transcripcional.

# LOS VIRUS MANIPULAN LA CROMATINA CELULAR

Como parásitos intracelulares obligatorios, los virus han desarrollado numerosas vías para secuestrar procesos celulares y utilizarlos en su propio beneficio. La función de la cromatina en la biología del virus depende en gran medida del ciclo infectivo del virus. No obstante, para aquellos virus que desarrollan funciones dentro del núcleo celular, la interacción con cromatina es inevitable. En algunos casos, la cromatina celular inhibe la expresión génica y la replicación del virus, ya que impide la accesibilidad al DNA. Las complejas propiedades dinámicas de la cromatina nuclear suponen un serio impedimento a la expresión génica viral y a la propagación del genoma. En otros casos, la cromatina celular proporciona al genoma viral una estructura y una organización necesarios para el correcto desarrollo del ciclo viral. En cualquier caso, los virus han adquirido numerosos mecanismos con objeto de manipular la cromatina celular para su propio beneficio (ver revisiones en (Ferrari et al., 2009; Lieberman, 2006; Lieberman, 2008; Minarovits, 2009; Mok & Lever, 2007)). En esta sección se indicarán varios ejemplos de estos mecanismos que son utilizados por virus de diferente naturaleza (**Tabla I.2**).

## 1 Virus DNA

Los virus DNA de doble cadena que replican en el núcleo eucariota utilizan normalmente la RNA polimerasa II celular para llevar a cabo la expresión génica viral. Debido a esta necesidad, estos virus deben de considerar el impacto que supone la cromatina en la replicación y transcripción activa. Los genomas de muchos virus DNA persisten en estado de latencia dentro del núcleo de la célula infectada y durante largos periodos de tiempo. En este estado, los genomas virales se asocian con histonas y pasan inadvertidos en la célula infectada, en contraste con lo que ocurre en infecciones líticas donde los genomas virales permanecen predominantemente libres de histonas. Esto parece sugerir la implicación de la cromatina, y su regulación, en el cambio entre los estadios lítico y latente.

### 1.1 Herpesvirus

Un importante esfuerzo de investigación en la actualidad está centrado en conocer de qué forma se establece un estado de cromatina abierta en el genoma de HSV-1 (Virus Herpes Simplex-1) y como se contrarresta la maquinaria de silenciamiento celular que tiende a formar cromatina sobre el DNA viral (ver revisión en (Knipe & Cliffe, 2008)). La proteína viral implicada en la formación de una estructura permisiva para la transcripción es VP16 (*Virion Protein 16*) que funciona como un potente activador transcripcional de los genes inmediatamente tempranos (IE). Varios estudios han determinado que VP16 recluta una gran cantidad de proteínas celulares que se requieren para la modificación y remodelación de nucleosomas en el genoma parental viral durante las etapas tempranas de la infección lítica (Herrera & Triezenberg, 2004). Entre las proteínas reclutadas en la zona promotora de los genes IE, se incluyen: las acetiltransferasas de histonas CBP y p300, los factores remodeladores de cromatina BRM, BRG1 y SNF2H, los factores generales de transcripción TFIID y la RNA polimerasa II (Bryant et al., 2011; Herrera & Triezenberg, 2004). Otro importante coactivador transcripcional celular utilizado por VP16 es HCF-1. Esta proteína es reclutada, en forma de complejo histona metil transferasa HCF-1-Set/MLL1, por VP16 en los promotores de genes IE, resultando en la trimetilación de H3K4 y la iniciación de la transcripción. La eliminación de HCF-1 lleva a la acumulación de H3K9me de represión, por lo que se sugiere que HCF-1 presenta una función central en la modulación de cromatina y en la expresión génica viral. En un estudio reciente (Liang et al., 2009), se ha destacado la importancia en el proceso de activación viral de la proteína celular LSD1, demetilasa de H3K9me que se asocia a HCF-1 en los promotores de genes IE. LSD1, junto a las H3K4 metil transferasas Set1 y MLL1, contrarresta la rápida acumulación de la marca de represión H3K9me en el genoma de HSV y favorece el enriquecimiento de la marca de activación H3K4me. Estos resultados sugieren también la posibilidad de controlar farmacéuticamente enzimas modificadoras de histona como estrategia para el control de las infecciones por herpesvirus.

### 1.2 Papilomavirus

Las infecciones por los virus del papiloma humanos (HPV) representan el factor de riesgo principal en el cáncer cervical. Las proteínas fundamentales en la capacidad oncolítica de HPV son E2, E6 y E7 que se expresan en las primeras

etapas del ciclo viral. La proteína E2 es una proteína reguladora esencial y su unión a la región reguladora del promotor temprano del genoma viral (LCR), controla la activación y represión transcripcional de los genes que codifican las proteínas E6 y E7. En la represión de estas importantes oncoproteínas virales también participa la proteína E8<sup>E2C</sup> (derivada de la fusión del dominio E8 con el extremo C-terminal de E2) y su interacción con proteínas relacionadas con cromatina, como el remodelador de cromatina CHD6 y TRIM28 (Fertey et al., 2010). Diversos estudios han indicado que la interacción entre la proteína celular Brd4 y E2 permite la unión de los episomas virales a los cromosomas mitóticos celulares en múltiples tipos de papilomavirus. Brd4, y su capacidad de unir cromatina acetilada a través de sus bromodominios, funciona como un reclutador de cromatina clave en los múltiples procesos llevados a cabo por E2 en el ciclo viral de HPV (Ilves et al., 2006; McBride et al., 2004; Schweiger et al., 2006).

Existen estudios que muestran como las proteínas E2, E7 y E8 virales bloquean las acetiltransferasas p300/CBP y P/CAF (Bernat et al., 2003; Patel et al., 1999; Peng et al., 2000), lo que sugiere una amplia manipulación de la capacidad transcripcional de la cromatina celular durante la infección por HPV. Otro mecanismo por el cual la proteína E7 de HPV contribuye a la manipulación epigenética global de la célula infectada consiste en la sobre-expresión de las demetilinas celulares KDM6A y KDM6B específicas del residuo H3K27 (McLaughlin-Drubin et al., 2011). Esto provoca la disminución del marcador H3K27 trimetilado, la desrepresión de genes regulados por complejos polycomb (entre ellos los genes *HOX*), y la reprogramación de la célula huésped (McLaughlin-Drubin et al., 2011). Además de la manipulación de enzimas modificadoras de cromatina, también se ha descrito la asociación de E7 con el remodelador de cromatina CHD4 (Brehm et al., 1999), y como una mutación puntual en E7 impide la asociación entre ambos y anula su capacidad de transformación celular.

### 1.3 Adenovirus

A pesar de que los adenovirus suelen desarrollar principalmente un ciclo viral lítico, las infecciones por estos virus representan el más claro ejemplo descrito hasta el momento de manipulación global de la maquinaria epigenética celular para forzar la transformación oncogénica. Por una parte, la proteína viral e1a tiene la habilidad de forzar la entrada en fase S de fibroblastos humanos. Diversos estudios han descrito como e1a recluta

p300/CBP y P/CAF para inducir la acetilación y activación de los promotores de genes implicados en crecimiento celular, división y síntesis de DNA (Ferrari et al., 2008). En estos estudios se realizaron ensayos ChIP-Chip con e1a viral a distintos tiempos post-infección y se observó una unión dinámica, transitoria y temporalmente ordenada de la proteína e1a a la región promotora del ~70% de los genes de fibroblastos humanos inducidos a entrar en fase S. A tiempos tempranos de infección, e1a se une no solo a la región promotora de genes implicados en la regulación del ciclo celular, sino también a genes implicados en la defensa contra patógenos (Ferrari et al., 2008). Se comprobó que la unión a genes celulares de e1a, que por sí sola no une DNA, dependía de su interacción con p300/CBP y proteínas RB. Dependiendo del tipo de asociación que establece e1a en las regiones promotoras, los genes son reprimidos o activados transcripcionalmente. Estos resultados describen a la proteína e1a, de tan solo 243 aas, no solo como una oncoproteína que induce una cascada de eventos dirigidos a la inducción de la transformación celular, sino como una proteína capaz de unir y regular prácticamente todas las regiones promotoras celulares con el fin de manipular el programa de expresión de la célula huésped para su propio beneficio.

La desregulación por parte de la proteína viral e1a del factor de transcripción E2F necesario para la expresión de los genes que inducen transformación celular, termina activando a p53, proteína celular crucial para la defensa contra cáncer y replicación viral. Recientemente, se ha identificado a la proteína E4-ORF3 de adenovirus como represor de p53 (Soria et al., 2010). Esta proteína silencia de forma selectiva la activación de los genes diana de p53 mediante la metilación del residuo H3K9 en la región promotora de estos genes. E4-ORF3 logra la heterocromatización de estos genes a través de las enzimas celulares SUV39H1 y SUV39H2, metilasas de H3K9.

## 2. Virus RNA

### 2.1 VIH y otros virus RNA que se integran en el genoma

Los virus que se integran en el genoma celular han desarrollado diversos mecanismos para la alteración de la cromatina celular durante los pasos de integración y reactivación. A pesar de que se sabe que la reacción de integración esta catalizada por la proteína viral integrasa (IN), la manera por la cual los retrovirus se unen e integran en regiones concretas de la cromatina tan solo se ha empezando



Virus	Proteína	Dianas Celulares	Efecto
Virus <i>Paramecium bursaria</i> Chlorella 1 (PBCV-1)	vSET1	-	Posee actividad KMT propia sobre residuo H3K27me, e induce represión transcripcional de la célula huésped.
SV40	Antígeno T	P300/CBP	Manipulación actividad HAT.
Adenovirus	e1a	P300/CBP, PCAF, DNMT1, p400, GCN5	Interacciona con enzimas celulares con actividad HAT, remodelación de cromatina y DNA metiltransferasa; Induce una reducción global de H3K18Ac.
	E4-ORF3	SUV39H1/2	Inactivación epigenética de genes regulados por p53.
HPV	E7	KDM6A, KDM6B, NuRD, p300/CBP, DNMT1	Sobre expresa las demetilases de residuos de lisina e induce una reducción global de H3K27me3; Asociación con enzimas de remodelación de cromatina, HAT y DNA metiltransferasa.
	E2	BRD4, p300/CBP	Segregación de genoma viral; unión a cromatina celular transcripcionalmente activa; Manipulación actividad HAT.
	E2^E8	CHD6	Remodelación de cromatina y represión de la expresión de E6/E7.
HSV	VP16	HCF-1 (Set1, MLL1, LSD1)	Permite metilación de H3K4 y contrarrestar acumulación de H3K9me en genoma viral.
EBV	Zta(BZLF1)	CBP	Manipulación actividad HAT.
	EBNA2	p300/CBP, INI5/SNF5	Remodelación de cromatina; Manipulación actividad HAT.
KSHV	LANA	DNMT1, -3A y -3B, SUV39H1	Asociación en promotores y reclutamiento de represores transcripcionales.
HIV	IN	INI5/SNF5, LEDGF/p75, EED, p300	Asociación y remodelación de cromatina; integración de DNA viral en genoma; Manipulación actividad HAT.
	TAT	p300/CBP, GCN5, P/CAF, TIP60, pTEFb	Estimulación de la metilación en H3K4 y H3K36 durante la reactivación viral; Manipulación actividad HAT.
HTLV-I	TAX	p300/CBP	Manipulación actividad HAT.
Virus influenza	vRNPs	Colas de histonas	Asociación con cromatina y/o matriz nuclear.
	M1	Histonas	Asociación con cromatina y/o matriz celular; ¿liberación de vRNPs para su exportación fuera del núcleo?

**Tabla I2. Ejemplos de proteínas virales y sus dianas celulares asociadas con la cromatina de la célula huésped.** Abreviaturas: HAT: acetiltransferasa específica de histonas; KMT: metiltransferasa de residuos de lisina; DNMT1: DNA metiltransferasa 1; KDM6: demetilasa de residuos de lisina 6; TIP-60: proteína de interacción a TATA 60. Adaptado de (Lieberman, 2006).

a esclarecer recientemente. Se cree que es el efecto que establece la estructura de la cromatina en el proceso de integración, el responsable de la diferente capacidad de selección de las integrasas retrovirales. Análisis recientes para la identificación de sitios de integración del DNA retroviral utilizando métodos de pirosecuenciación masiva (Bushman et al., 2005; Bushman et al., 2008), han mostrado como el proceso de integración se encuentra principalmente favorecido hacia regiones cercanas a modificaciones de histona asociadas a transcripción activa (marcadas por H3K4me y H3/H4 acetiladas) frente a regiones con modificaciones correlacionadas con inhibición transcripcional (enriquecidas con H3K27me y metilación en islas CpG). Estos estudios destacan la integración selectiva dirigida por IN de VIH-1, y sugieren una conexión entre IN y la maquinaria de la cromatina celular. De acuerdo con esta conexión, se han identificado varios cofactores asociados a cromatina como importantes en el proceso de la integración mediada por IN. Entre ellos cabe destacar INI1 (también llamada hSNF5), componente del complejo remodelador de cromatina hSWI/SNF que interacciona directamente con IN de VIH-1 y estimula la integración viral (Kalpana et al., 1994; Lesbats et al., 2011).

Una vez integrado en el genoma de la célula huésped, el proceso de represión y reactivación de VIH depende también de la modulación de la cromatina celular. De acuerdo con ello, se han identificado los factores Chd1, Spt6 y FACT, implicados en la facilitación del inicio de la elongación transcripcional de la célula, como represores de la transcripción desde genomas de VIH-1 latentes (Gallastegui et al., 2011; Vanti et al., 2009). En el proceso de reactivación se sabe que los activadores transcripcionales TAX y TAT de los virus HTLV-I y VIH, respectivamente, interaccionan con numerosos factores remodeladores de cromatina y enzimas modificadoras de histona (Easley et al., 2010). Estos resultados parecen reflejar la importancia de la manipulación de la cromatina durante el proceso de reactivación viral.

## 2.2 El virus de la gripe

A pesar de que los virus RNA no se empaquetan en nucleosomas, existen evidencias de virus que replican en el núcleo, interaccionan con la matriz nuclear y, por lo tanto, deben relacionarse con la cromatina celular. Además, varios virus RNA de hebra negativa también dependen de numerosa maquinaria nuclear estrechamente regulada por la cromatina celular. Todo esto sugiere que los virus RNA, al igual que los virus DNA, deben de

considerar el contexto de la cromatina para poder completar sus ciclos virales.

El **virus de la gripe** es el único virus dentro de esta categoría del cual se ha descrito, con cierto detalle, una asociación funcional y estructural con la cromatina celular. Estudios de fraccionamiento bioquímico y ensayos *in situ* de marcaje por pulso de RNA indican que una parte importante de las RNPs está íntimamente unida a la matriz nuclear o a componentes de la cromatina (Bui et al., 2000; Bukrinskaya et al., 1979; Jackson et al., 1982; Lopez-Turiso et al., 1990). Más recientemente, en ensayos *in vitro*, se han obtenido resultados que muestran como la transcripción y la replicación viral ocurren en fracciones insensibles a DNasa, incluyendo cromatina y/o la matriz celular (Takizawa et al., 2006). Además, experimentos de fluorescencia *in vivo* muestran una reducción importante en la movilidad de las RNPs comparado al esperado por difusión libre (Huet et al., 2010; Loucaides et al., 2009; Wang et al., 2008). Estos estudios sugieren la unión de RNPs virales a fracciones insolubles del núcleo celular, y la posible implicación de la cromatina celular en varios procesos del ciclo del virus de la gripe.

Se ha observado la interacción directa entre proteínas virales y nucleosomas (García-Robles et al., 2005; Zhirnov & Klenk, 1997). Ensayos de interacción *in vitro* han mostrado la unión de vRNPs, NP libre y M1 con nucleosomas purificados. La asociación que establecen NP y las vRNPs es a través de las colas de histonas ya que ésta no tiene lugar al pre-tratar los nucleosomas con tripsina. Por otro lado, la asociación de M1 con histonas es independiente del tratamiento con tripsina y, por lo tanto, ocurre a través del núcleo de histonas. Estos resultados parecen postular que la transcripción y replicación viral ocurren ligados a nucleosomas y que M1 podría estar implicada en la salida de las vRNPs de la cromatina en etapas tardías de infección. Además, la interacción de las proteínas virales con colas de histonas podría influenciar la transcripción de genes celulares.

El enlace funcional que el virus de la gripe establece con la cromatina celular ocurre, principalmente, a nivel de la manipulación de los procesos de transcripción y *splicing* celulares. Como se explicó en los apartados anteriores, ambos procesos dependen en gran medida de la cromatina y de los mecanismos de regulación que actúan sobre esta macroestructura y, en relación al virus de la gripe, son estrictamente necesarios para el correcto funcionamiento de la maquinaria de expresión génica viral. Para muchos virus RNA, que normalmente replican en el citoplasma sin requerimientos obvios

de la actividad transcripcional celular, la maquinaria de transcripción celular supone una diana lógica de bloqueo como mecanismo de inhibición de la expresión génica celular (mayormente, se busca bloquear la expresión de genes relacionados con la respuesta antiviral). El virus de la gripe es una excepción, ya que replica en el núcleo de la célula infectada y requiere de una RNAP II celular activa (Elton et al., 2005b). En concreto, la polimerasa viral corta los mRNAs celulares para producir fragmentos de RNA que son necesarios para iniciar la síntesis de mRNA viral (Bouloy et al., 1978; Krug et al., 1979). También se ha descrito la interacción entre la polimerasa viral y el dominio C-terminal de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II celular (RNAP II) (Engelhardt et al., 2005). La interacción se establece con la forma fosforilada de RNAP II que esta implicada en iniciación, por lo que esta asociación permitiría a la polimerasa viral posicionarse en un lugar privilegiado desde donde poder cortar los mRNAs celulares que se están sintetizando *de novo*, y secuestrar la maquinaria celular que necesita para los procesos de *splicing*, ensamblaje de mRNPs, etc. Es más, el virus necesita una transcripción mediada por la RNAP II continuada para la exportación de mRNAs virales (Amorim et al., 2007). Por lo tanto, el virus influenza es absolutamente dependiente de transcripción activa por la RNAP II celular, como quedo ya reflejado hace casi 35 años en los primeros experimentos que mostraron el bloqueo de la replicación viral a través del uso de  $\alpha$ -amanitina y actinomicina D, inhibidores de la RNAP II (Bouloy et al., 1978; Rott & Scholtissek, 1970; Krug et al., 1979).

Aparte de esta dependencia absoluta por la transcripción celular, el virus de la gripe termina desactivando y degradando la RNAP II celular (Chan et al., 2006; Rodríguez et al., 2009; Rodríguez et al., 2007; Vreede et al., 2010). Se ha sugerido que la asociación del complejo de la polimerasa viral con el extremo CTD de la RNAP II no solo le permitiría obtener los beneficios ya indicados, sino también sería responsable de la inhibición de la expresión génica celular (Vreede et al., 2010).

Otra actividad relacionada con la transcripción mediada por la RNAP II es el proceso de *splicing*, también dependiente de la cromatina celular y su regulación. Algunos transcritos virales requieren de *splicing* y el virus, al no codificar proteínas para llevar a cabo dicha función, depende totalmente de la maquinaria de *splicing* celular. Ensayos recientes de silenciamiento multigénico para la identificación de factores celulares necesarios en la replicación del virus de la gripe (Brass et al., 2009; Karlas et al., 2010; König et al., 2010; Shapira et al., 2009), han mostrado un número importante

de proteínas relacionadas funcionalmente con el proceso de *splicing* de pre-mRNAs celulares, que probablemente sean necesarios para el *splicing* de mRNAs virales. Entre estas proteínas se encuentran factores como CLK1, SNRP70, SF3A1, PRPF8 y NHP2L1. Anterior a estos trabajos, se había descrito la interacción de la proteína viral NP con el factor de *splicing* BAT-1/UAP56 (Momose et al., 2001), y de la polimerasa viral con los factores hnRNP H1, p68/DDX5 y SFPQ/PSF (Jorba et al., 2008). La proteína viral NS1, además de regular el *splicing* de mRNAs virales, se asocia con U6 snRNAs celulares y ejerce un efecto negativo general sobre el *splicing* de pre-mRNAs celulares (Fortes et al., 1994; Qiu et al., 1995). Por lo tanto, las primeras etapas del proceso de expresión génica viral dependen fuertemente de las maquinarias de transcripción y *splicing* celulares.

Una incógnita emergente es conocer la influencia que ejerce la cromatina celular como factor de regulación imprescindible en los mecanismos de transcripción y *splicing* celulares. Además, teniendo en cuenta la presencia ubicua de la cromatina celular en el núcleo de la célula infectada y los datos ya indicados anteriormente sobre el comportamiento del virus de la gripe en este espacio, no se descarta la implicación de esta macroestructura en otros procesos virales como la entrada de vRNPs paternos, la replicación viral, la inhibición de poliadenilación celular, el tráfico intranuclear de proteínas y complejos virales, el cambio de transcripción a replicación virales, retención y exportación de mRNPs y vRNPs progenie virales, etc.

Por último, además de las manipulaciones en las maquinarias de transcripción y *splicing* celulares, también existen multitud de trabajos que indican como durante la infección por gripe se induce una importante remodelación de la arquitectura nuclear de la célula huésped (revisado en (Josset et al., 2008)). Se han caracterizado numerosas interacciones entre proteínas virales y proteínas nucleares que forman parte constitutiva de diversas estructuras y compartimentos nucleares y que suelen terminar alteradas durante la infección. La proteína viral NS1 induce un mayor número de cuerpos de Cajal con un tamaño menor al normal (Fortes et al., 1995). Estos compartimentos están implicados en la generación, tráfico nuclear y modificación post-transcripcional de snRNP y snoRNP (partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares y nucleolares, respectivamente). Los gránulos *nuclear speckles*, donde se almacenan factores de *splicing* y pre-mRNAs, también son desorganizados por la proteína NS1 y pasan de tener una distribución con un patrón granulado uniforme a uno mucho más difuso (Fortes et al., 1995). También se ha descrito

la acumulación de las proteínas virales M1, NS1 y NEP en los cuerpos PML, cuerpos multifuncionales que contribuyen al estado antiviral debido a la respuesta interferon, e inducen un mayor número de

cuerpos PML de tamaño superior al normal (Chelbi-Alix et al., 1998; Guldner et al., 1992; Sato et al., 2003).

ANTECEDENTES: BUSQUEDA  
DE FACTORES ASOCIADOS A  
LA SUBUNIDAD PA DEL VIRUS  
DE LA GRIPE

En nuestro laboratorio se han estudiado y caracterizado varios aspectos de la función de la subunidad PA de la polimerasa viral. Con objeto de estudiar las relaciones que el virus de la gripe establece con la célula infectada, realizamos una búsqueda de factores celulares que pudieran interactuar con la subunidad PA y posiblemente ejercer algún efecto en sus actividades. La búsqueda se realizó mediante ensayos de doble-híbrido en levadura, donde rescatamos la interacción con dos clones que resultaron ser las proteínas humanas CHD6 (clon PA1) y hCLE/CGI-99 (clon PAi13) (Huarte et al., 2001) (Fig. I9). Ambas proteínas también interactúan con clones de PA que presentan una delección en el extremo amino terminal (dejando sólo los últimos 252 aminoácidos carboxilo terminal) o la mutación puntual T157A que disminuye su capacidad de proteólisis, lo que descarta la implicación de esta región en la unión a estos factores.

hCLE/CGI-99 ha sido relacionada con la transcripción celular ya que interacciona con la subunidad mayor de la RNAP II y se encuentra presente en sitios de transcripción activa mediada por la polimerasa celular (Pérez-González et al., 2006). Además, datos de expresión génica en células silenciadas para hCLE muestran una disminución en la expresión de un alto número de genes celulares lo que sugiere su actuación como modulador general de la transcripción mediada por la RNAP II. Estudios de la implicación de hCLE en la infección por el virus de la gripe indican su participación como modulador positivo de la replicación viral y su incorporación en viriones (Rodríguez, A., 2009).

CHD6 pertenece a una familia de remodeladores de cromatina de reciente caracterización. Aunque la función de CHD6 en la célula no ha sido estudiada en detalle, sí ha sido implicado en varias vías de transcripción celular y se le ha relacionado con la regulación de la expresión génica de un virus DNA (Tabla I1 e I2). Teniendo en cuenta la asociación de CHD6 con PA viral por ensayo de doble híbrido, un objetivo en nuestro laboratorio ha sido conocer la posible implicación de ésta proteína en la replicación del virus de la gripe. Otro objetivo abordado es el estudio de la interrelación entre CHD6, cromatina celular y el virus de la gripe, y de esta forma analizar posibles cambios celulares a nivel de cromatina inducidos durante la infección.




		Grado de interacción	
		GAD-PAi1	GAD-PAi13
		CHD6	hCLE
	GBD-PAwt	+++	+++
	GBD-PA157	+++	+++
	GBD-PAΔ1-154	+++	+++

Figura I9. Datos de interacción en ensayo de doble híbrido utilizando la proteína PA viral como cebo. El clon pGBTPA que expresa la proteína PA completa fusionada con el dominio de unión al promotor de GAL4 se cotransfecta con una librería de cDNAs de riñón humano fusionados al dominio de activación de GAL4 y construidos en el plásmido pGAD. Los únicos clones positivos capaces de pasar todos los filtros impuestos fueron GAD-PAi1 (CHD6) y GAD-PAi13 (hCLE). El mismo resultado se obtuvo cuando el ensayo se llevó a cabo usando como cebos las construcciones pGBTPAT157A (con mutación puntual en residuo 157 de PA crítico en la actividad proteolítica atribuida a PA) y pGBTPAΔ1-154 (con 154 aminoácidos deleccionados en el extremo N-terminal).





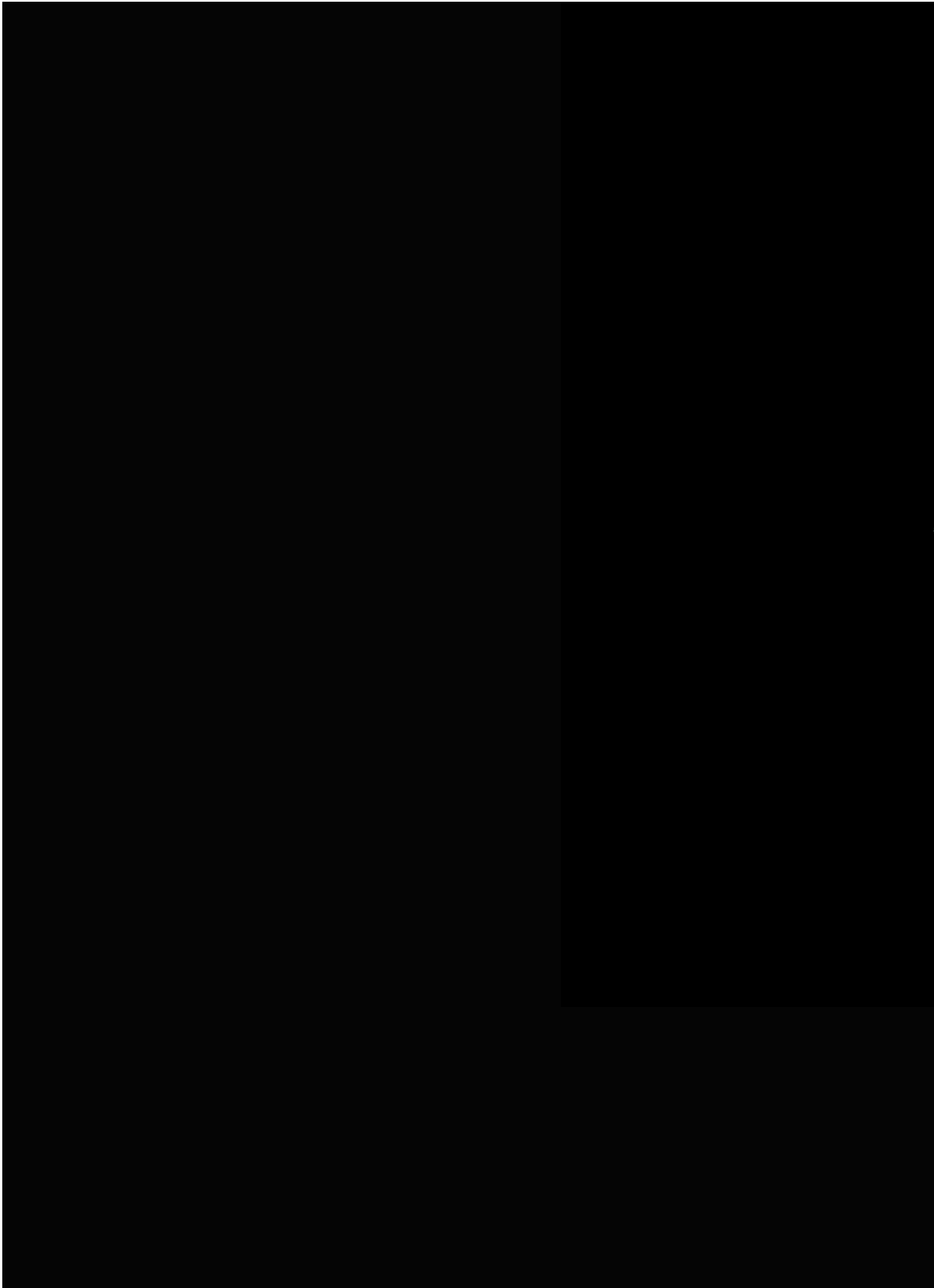
# OBJETIVOS

Estudios previos en nuestro laboratorio habían identificado a la proteína celular CHD6 como un factor asociado a la polimerasa del virus de la gripe a través de la interacción con la subunidad PA. CHD6 pertenece a una familia de remodeladores de cromatina dependientes de ATP y contiene por lo menos un dominio que le podría permitir asociarse a cromatina. Además, una caracterización inicial de la función celular de CHD6, indica su asociación con sitios de síntesis de mensajero celular, lo cual sugiere su participación como factor de transcripción.

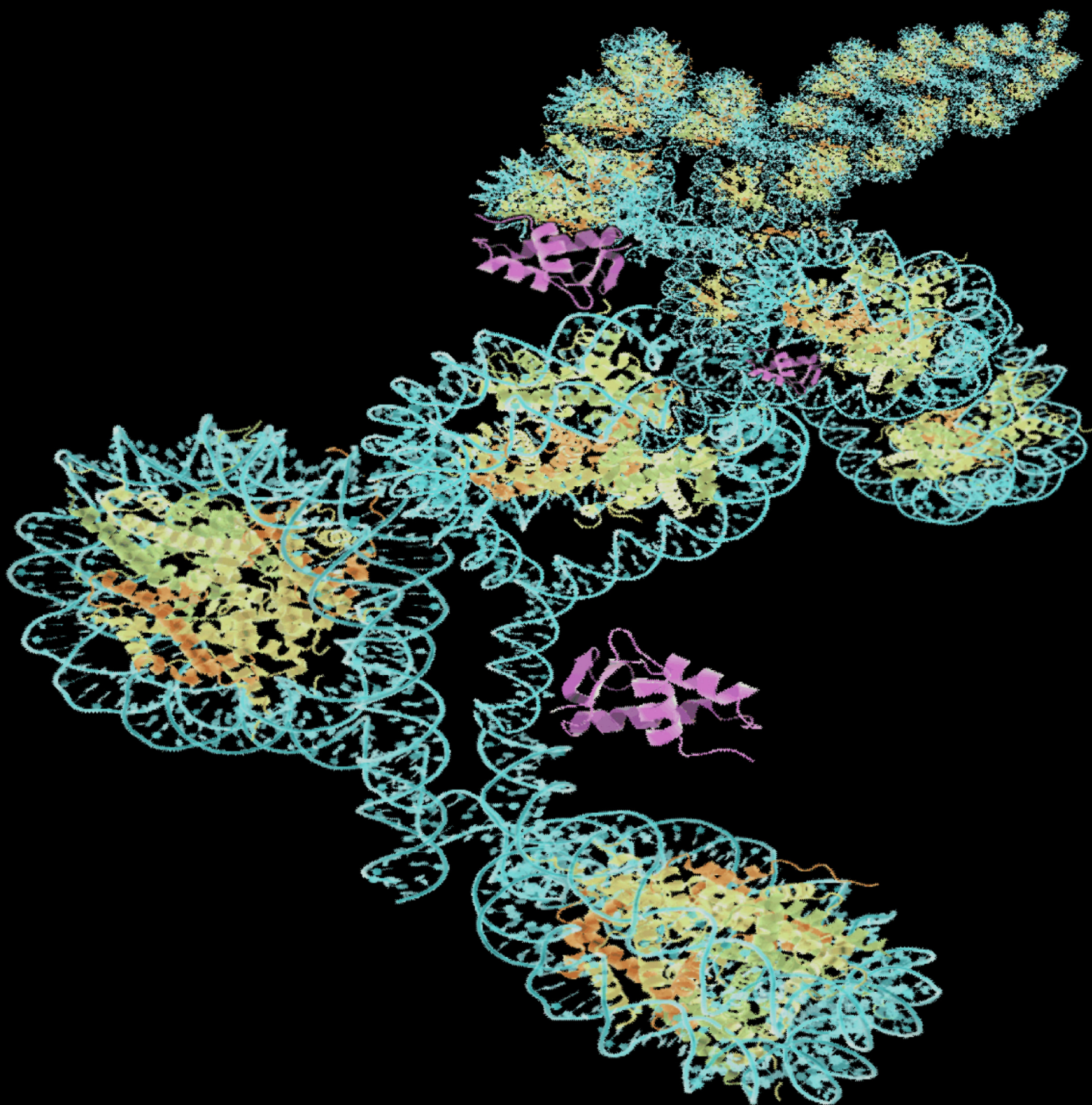
Teniendo en cuenta datos que destacan la fuerte relación que la polimerasa del virus de la gripe establece con la maquinaria de transcripción celular y la cromatina nuclear, nos pareció muy interesante profundizar en la posible implicación del factor asociado CHD6 en la infección por el virus de la gripe.

Con estos antecedentes, nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

1. - Analizar las interacciones que pudiera establecer CHD6 con las demás proteínas que forman parte de las RNPs virales.
2. - Estudiar la relevancia funcional de la proteína celular CHD6 en la infección por el virus de la gripe.
3. - Analizar el efecto que la infección por el virus de la gripe tiene sobre CHD6.
4. - Estudiar cambios que pudieran ocurrir en marcadores de cromatina activa e inactiva durante la infección por el virus de la gripe.







# **MATERIALES y MÉTODOS**



## MATERIALES BIOLÓGICOS

### LINEAS CELULARES EUCARIOTAS

- **HEK293T**: línea de células embrionarias de riñón humanas (Graham et al., 1977). Ceditas por J.C. de la Torre.

- **A549**: línea de células epiteliales de carcinoma de pulmón humano (Giard et al., 1973). Ceditas por J.A. Melero.

- **MDCK**: línea de células de riñón de perro (Madin and Darby, 1958). Obtenida de la ATCC.

### BACTERIAS

- La cepa bacteriana **E. coli DH5α** se utilizó para la amplificación de todos los plásmidos.

### VIRUS

#### - Cepas del virus de la gripe de laboratorio:

- A/Victoria/3/75 (H3N2) (**VIC**).

- A/WSN/33 (H1N1) (**WSN**).

- A/PR/8/34 (H1N1) (**PR8**).

- A/Ann Arbor/6/60 *cold-adapted* (H2N2) (**AAca**).

#### - Cepas del virus de la gripe de campo:

HUMANAS:

- A/England/1/51 (H1N1) (**E**).

- A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (**NC**).

- A/California/07/09 (H1N1) (**CAL**).

- A/Wyoming/3/2003 (H3N2) (**Wy**).

AVIAR:

- A/Turkey/Wisconsin/66 (**H9N2**).

#### - Virus de la gripe recombinantes:

- Virus recombinante con los segmentos genómicos PA, PB1, PB2 y NP procedentes de la cepa VIC y el resto de segmentos procedentes de la cepa WSN (Huarte et al., 2003).

#### - Otros Virus:

- Virus **VSV** del serotipo New Jersey fue cedido por M. Esteban.

- **Adenovirus** de serotipo 5 fue cedido por P. Fortes.

### PLÁSMIDOS

- **pCMV-PB1, pCMV-PB2, pCMV-PA y pCMV-NP**: plásmidos con promotor de citomegalovirus (CMV) para la expresión de las tres subunidades de la polimerasa y de NP de la cepa VIC. Construidos y cedidos por J. Ortega (Falcón et al., 2004; Mena et al., 1994).

- **pHH-NS-LUC**: plásmido con promotor de la RNA polimerasa I, para la expresión del gen luciferasa con polaridad negativa y franqueado por los extremos no codificantes del segmento genómico NS.

- **pSUPER.retro.puro (pSR.puro)**: plásmido con promotor H1 de la RNA polimerasa III para la expresión de la estructura de silenciamiento génico shRNA (Brummelkamp et al., 2002). Adquirido a *Oligoengine*.

### ANTICUERPOS

- Los anticuerpos monoclonales específicos para las subunidades de la polimerasa **PB2** (8 y 28) y **PA** (2 y 9), han sido descritos previamente (Bárcena et al., 1994; Ochoa, 1995).

- El suero policlonal contra la proteína **PB1** se obtuvo por inmunización de conejos con proteína purificada y fue cedido por el laboratorio de J. Ortín.

- El suero de rata específico contra la proteína **NP** fue generado por hiperinmunización de ratas con la proteína purificada His-NP. El anticuerpo policlonal de conejo contra NP fue generado de igual manera en conejo (Resa-Infante et al., 2008). Ambos fueron cedidos por el laboratorio de J. Ortín.

- El anticuerpo monoclonal específico contra la **RNAP II, 8WG16**, reconoce la forma desfosforilada en Ser2 de la polimerasa celular y fue adquirido a *Covance*.

- Los anticuerpos monoclonal y policlonal de conejo contra **CHD6** fueron adquiridos a Abcam y Bethyl, respectivamente.

- Los anticuerpos policlonales de conejo utilizados contra **CHD3** fueron adquiridos a Bethyl y a Transduction Laboratories.

- Los anticuerpos policlonales de conejo anti- **H3, H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 y HP1α** fueron adquiridos a *Active Motif*.

- La mezcla de anticuerpos monoclonales que reacciona contra todos los 41 serotipos de **Adenovirus, MAB805**, fue adquirido a *Millipore*.

- El anticuerpo policlonal de conejo contra ubiquitina fue adquirido a *Santa Cruz Biotechnology*.

- El anticuerpo monoclonal contra **β-tubulina** fue adquirido a *Sigma*.

El origen y la dilución de uso de los

distintos anticuerpos empleados en *Western blot* e Inmunofluorescencia se resumen en la **Tabla M1 y M2**, respectivamente.

## RESINAS DE AFINIDAD

- La resina **Protein A-Sepharose** fue adquirida de *Sigma*.

- La resina de **Avidina monomérica-agarosa** fue adquirida a *Pierce*.

## REACTIVOS, DROGAS Y OTROS MATERIALES BIOLÓGICOS

Las drogas actinomicina D y Dicloro-beta-D-ribofuranosil bezimidazol (DRB), el inhibidor del proteasoma MG-132, y los antibióticos cicoheximida y puromicina fueron adquiridas a *Sigma*. El inhibidor de proteasas "Complete" se obtuvo de *Roche*. En el ensayo de unión a péptidos sintéticos de histona 3 se utilizaron péptidos biotinilados adquiridos a *Millipore*.

## MÉTODOS

### MANIPULACIÓN DE DNA Y CLONAJES

Los plásmidos de silenciamiento empleados fueron generados siguiendo especificaciones de *Oligoengine*. Brevemente, se diseñaron oligonucleótidos que contienen las secuencias siRNA contra CHD6 en ambos sentidos, la secuencia de la horquilla y sitios de corte para BglII y HindIII en los extremos. En base a este diseño se sintetizaron químicamente 2 secuencias complementarias, se anillaron y se ligaron en el vector pSR-puro digerido con BglII y HindIII. Los plásmidos resultantes, anotados como pSR-puro.siCHD6.1 y pSR-puro.siCHD6.2, expresan short-hairpin RNAs (shRNAs) complementarios a las regiones 4539-4559 y 4795-4813 de la secuencia codificante de CHD6, respectivamente. La región del transcrito de CHD6 que comprende estas dos dianas de silenciamiento presenta muy baja homología en secuencia nucleotídica con otros miembros de la subfamilia III de remodeladores de cromatina CHD.

Como plásmido control de silenciamiento se utilizó pSR-puro.TM que expresa un shRNA no silenciante y derivado de un transcrito de la bacteria *Thermotoga maritima* (Rodríguez, 2009). La secuencia de este siRNA, AATTCTCCGAACGTGTCACGT, no hibrida con ningún gen de mamífero conocido.

Todos los clonajes fueron confirmados por secuenciación directa.

### MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

#### 2.1 Mantenimiento de cultivos celulares:

Las líneas celulares HEK293T y A549 se cultivaron en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y aminoácidos no esenciales. La línea celular MDCK se cultivó en DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales y con FBS al 5%. Para la tripsinización de las líneas celulares A549 y MDCK se utilizó Tripsina-EDTA mientras que para la línea HEK293T se diluyó la solución al 10%. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 2.2 Transfecciones:

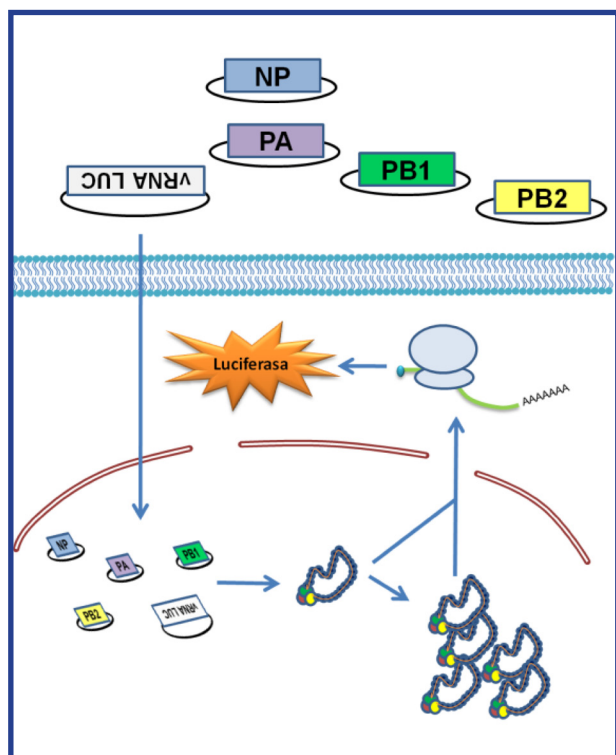
La transfección con fosfato cálcico de cultivos subconfluentes de células HEK293T se realizó según el protocolo descrito (Graham and van der Eb, 1973; Wigler et al., 1979). Brevemente, para la transfección de 1x10<sup>7</sup> células se mezclaron 20-30 µg de plásmido con 500 µl de CaCl<sub>2</sub> que posteriormente se añadieron gota a gota sobre 500 µl de solución HBS (50 mM HEPES, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 140mM NaCl, pH 7.05). Tras 1 minuto de incubación se añadió la mezcla suavemente sobre las células y se incubaron a 37 °C durante 24 h. En caso de partir de un número menor de células, se escaló proporcionalmente la cantidad de reactivos.

La transfección de células A549 se realizó utilizando Lipofectamina 2000 (*Invitrogen*). Para la transfección de 1x10<sup>7</sup> células, se incubaron 50 µl de Lipofectamina 2000 con medio OPTIMEM hasta un volumen final de 1 ml a temperatura ambiente durante 15 min. Esta preparación se mezcló con otro volumen de 1 ml de Optimem que contiene 20-30 µg del plásmido a transfectar, y se incubó durante 15 min. Finalmente, se añadió la preparación sobre las células de cultivo con 8 ml de medio DMEM + 5% FBS, agitando suavemente. Después de una incubación de 6 h a 37 °C se cambió el medio con DMEM + 10% FBS.

#### 2.3 Aislamiento de núcleos:

Los núcleos de células HEK293T que posteriormente fueron utilizados para ensayos de unión a péptidos sintéticos de histona 3 (detallado en el apartado 2.4.3) se aislaron utilizando la adaptación de un protocolo anterior (Andersen et al., 2002). Las células se recogieron con PBS a 4 °C y fueron lavadas varias veces con PBS suplementado con inhibidores de proteasas (*Roche*). Después, fueron resuspendidas en tampón A (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT e inhibidores de proteasas (*Roche*)), se incubaron en hielo durante 10min y se procesaron 10 veces con un homogeneizador Dounce. Los núcleos resultantes fueron purificados centrifugándolos a través de una cama de 0.35 M sacarosa. Se resuspendieron con un tampón de congelación (50 mM Tris-HCl pH 8.0, Glicerol 10%, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA e inhibidores de proteasas (*Roche*)) y se congelaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido, para después guardarse a -80 °C hasta el momento de su utilización.





**Figura M2. Reconstitución de RNPs virales recombinantes y expresión de actividad luciferasa.** Se cotransfectó la línea celular HEK293T con cuatro plásmidos que contienen el cDNA de las subunidades PB1, PB2, PA y NP bajo el promotor de CMV, junto con un plásmido que codifica la secuencia del gen reportero luciferasa flanqueado por las regiones 5' y 3' del vRNA viral del segmento NS.

## 2.4 Reconstitución de RNPs virales y medida de actividad luciferasa:

Las distintas líneas HEK293T estables utilizadas en estos ensayos fueron cuantificadas para sembrar el mismo número de células en cada punto. Las transfecciones para la reconstitución de RNPs activas de virus VIC se realizó en cultivos subconfluentes de células HEK293T utilizando el método de fosfato cálcico (Wigler et al., 1979). Se cambió el medio, añadiendo medio DMEM enriquecido con 10% de FBS y 4 h después se transfectaron, para  $3 \times 10^5$  células, las siguientes cantidades de plásmido: pCMV-PB1 (250 ng), pCMV-PB2 (250 ng), pCMV-PA (50 ng), pCMV-NP (1  $\mu$ g) y pHH-NS-luciferase (1  $\mu$ g). Los cultivos celulares se incubaron 18 h a 37°C (Fig. M1).

En los ensayos de medida de actividad luciferasa, se reconstituyeron RNPs virales como se describió en el párrafo anterior, y se midió la actividad del gen reportero acumulado utilizando el Kit comercial de Promega.

## 2.5 Generación de líneas celulares estables:

### 2.5.1 HEK293T-TM, -siCHD6.1, -siCHD6.2:

Células HEK293T subconfluentes en pocillos p35 fueron transfectadas, aplicando el protocolo de transfección por fosfato cálcico, con 2  $\mu$ g de los plásmidos de silenciamiento pSR-puro.TM, pSR-puro.siCHD6.1 y pSR-puro.siCHD6.2, cada uno de forma separada. 24 horas después de la transfección, se lavaron varias veces las células con PBSc y se añadió nuevo medio DMEM + FBS10% con 2.5  $\mu$ g/ml de puomicina. Durante la selección se lavaron regularmente las células añadiendo cada 48 horas nuevo medio con puomicina. Las líneas celulares fueron amplificadas y congeladas a -80 °C. El grado de silenciamiento fue analizado por WB contra CHD6.

### 2.5.2 A549-TM, -siCHD6.1, -siCHD6.2:

Células A549 en p100 al 60-70 % de confluencia fueron transfectadas, aplicando el protocolo de transfección por lipofectamina 2000, con 20-30  $\mu$ g de los plásmidos de silenciamiento pSR-puro.TM, pSR-puro.siCHD6.1 y pSR-puro.siCHD6.2, cada uno de forma separada. 24 horas después de la transfección, se cambió el medio de crecimiento con nuevo fresco y con puomicina a 0.5  $\mu$ g/ml. Las líneas celulares resistentes a la selección fueron amplificadas y congeladas a -80 °C. El grado de silenciamiento fue analizado por WB contra CHD6.

## TÉCNICAS VIROLÓGICAS

### 3.1 Infecciones en células de cultivo:

Las infecciones con las distintas cepas de virus se realizaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 2-7.5 unidades formadoras de placa por célula (PFU/célula) (alta multiplicidad). Todas las infecciones se realizaron sobre monocapas de células confluentes y subcultivadas el día anterior. Se retiró el medio de cultivo de las células, se realizó un lavado con PBSc y se añadió el inóculo viral preparado con DMEM. Tras 1h de incubación a temperatura ambiente, se retiró el inóculo y se añadió DMEM sin suplementar con suero. A partir de este punto, se recogieron los extractos a los tiempos indicados en cada experimento.

**3.2 Generación de stocks de virus:**

Se infectaron monocapas de células MDCK a baja MOI ( $10^{-3}$  o  $10^{-4}$  PFU/cel). Tras 36-60h de incubación a 37°C, cuando se observa un 50% de efecto citopática en la monocapa, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares. Se centrifugaron durante 5 min a 4°C y 2500 rpm para retirar desechos celulares, se alicuotearon y se guardaron congelados a -80°C.

**3.3 Titulación de virus mediante ensayo de placa:**

Se infectaron monocapas de células MDCK con diluciones decimales seriadas de virus preparadas en tampón PBSc suplementado con 5 µg/ml BSA y se incubaron durante aproximadamente 72 h a 37 °C en un medio semisólido con DMEM, 0.7% agar, 1% DEAE-dextrano y 2.5 µg/ml de tripsina. Cuando las placas de virus resultaron visibles, las células se fijaron con 10% formaldehído, se tiñeron con una solución de cristal violeta y se hizo un recuento de las placas. Para el cálculo del título viral se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{TÍTULO} = (\text{N}^{\circ} \text{ de placas} \times 1/\text{Factor de dilución}) \times (1/$$

Volumen del inóculo vírico (ml))

**3.4 Curvas de crecimiento:**

Las distintas líneas A549 estables utilizadas en estos ensayos fueron cuantificadas para sembrar el mismo número de células en cada punto. Se infectaron monocapas de células con una multiplicidad de infección de  $10^{-3}$  PFU/cel. A distintos tiempos post-infección, se recogieron alícuotas de sobrenadantes que se centrifugaron para la eliminación de restos celulares. Posteriormente, se determinó el título de virus para cada tiempo aplicando el protocolo detallado en el apartado 3.2 de Materiales y Métodos.

**3.5 Infecciones en ratones:**

Se pseudo-infectaron o infectaron ratones intranasalmente con  $5 \times 10^5$  PFU/ratón de virus recombinante que contiene los segmentos genómicos PA, PB1, PB2 y NP procedentes de la cepa VIC y el resto de segmentos procedentes de la cepa WSN (Huarte et al., 2003). Se midió el peso de los animales diariamente y, a diferentes

Anticuerpo	Procedencia	Dilución
α-CHD6	Conejo	1:1000
α-CHD3	Conejo	1:300
α-PA (2, 9)	Ratón	1:20
α-PB2 (8, 22)	Ratón	1:100
α-PB1	Conejo	1:1000
α-NP	Conejo	1:5000
α-β-tubulina	Ratón	1:15000
α-H3	Conejo	1:5000
α-H3K4me3	Conejo	1:1000
α-H3K9me3	Conejo	1:1000
α-H3K27me3	Conejo	1:1000
α-RNAPII/8WG16	Ratón	1:500
α-HP1α	Conejo	1:1000
α-Ratón Perox. (secundario)	Cabra	1:3000
α-Conejo Perox. (secundario)	Cabra	1:15000

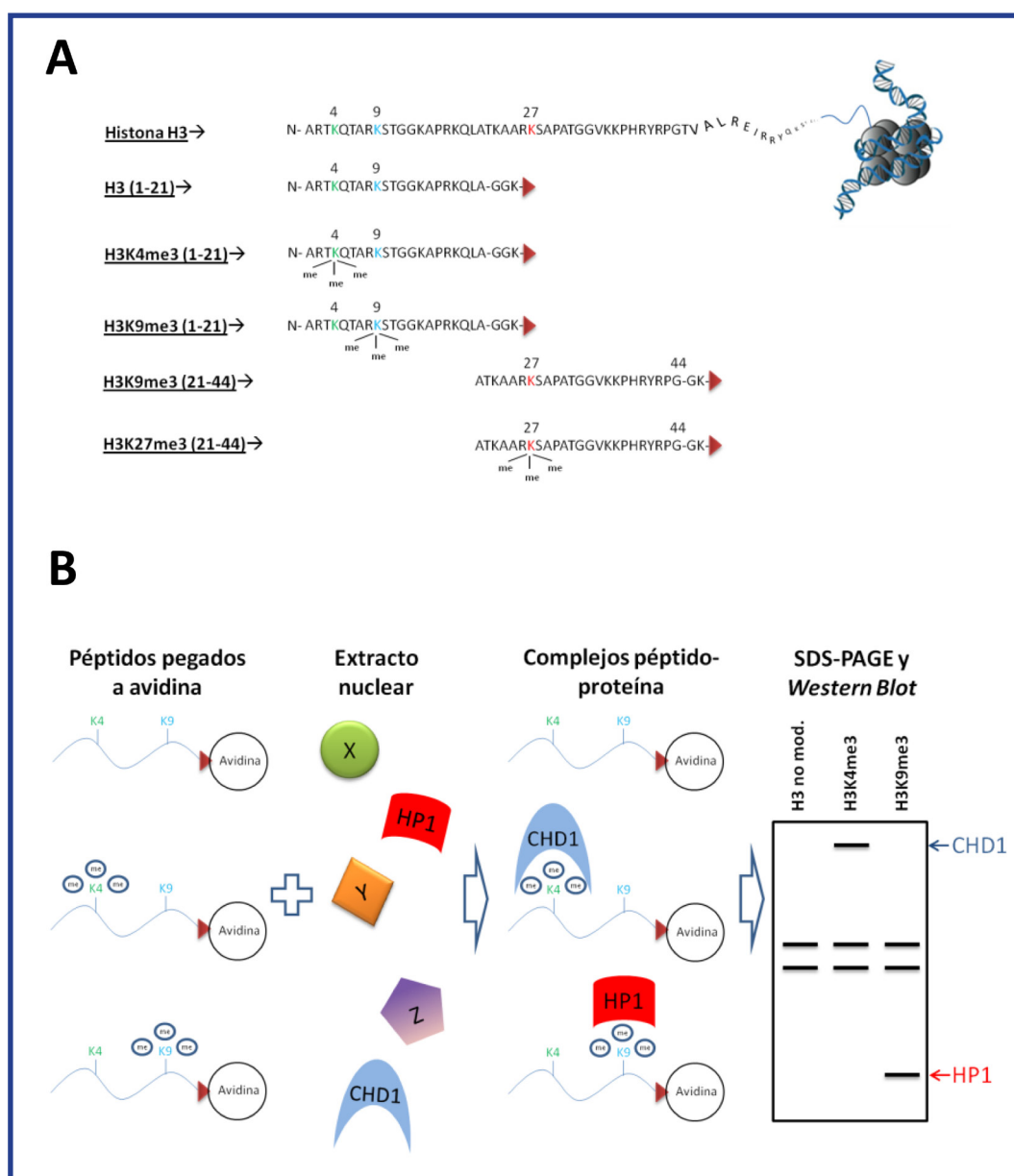
Tabla M1. Anticuerpos para *Western blot*. Para cada uno de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en *Western blot* se indica el origen y la dilución empleados.

días después de la inoculación, los animales fueron sacrificados y sus pulmones extraídos. Los pulmones se homogenizaron en PBS/0.3% BSA utilizando un homogenizador Dounce y el lisado celular resultante se resuspendió en tampón Laemmli. Las proteínas se analizaron por *Western blot*.

#### 4.1 Western blot:

Los extractos celulares se recogieron con tampón Laemmli y las proteínas se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al porcentaje adecuado. Se transfirieron en membranas Immobilon (*Millipore*) para, después, ser bloqueadas con solución de 3% BSA o 5% leche desnatada en PBS previo a la incubación con anticuerpos primarios específicos. Posteriormente, se lavaron la membranas repetidas veces con PBS

## ANÁLISIS DE PROTEÍNAS



**Figura M2. Ensayo de unión a péptidos sintéticos de histona 3 (pull-down).** (A) Representación gráfica del extremo amino terminal de la cola de la histona H3 y los péptidos sintéticos utilizados en el ensayo de pull-down. El icono representado con un triángulo rojo marca el motivo de biotina situado en el extremo carboxilo terminal de los péptidos. (B) Representación gráfica del ensayo de unión a péptidos sintéticos de histona H3 (ver apartado 4.3 de Materiales y Métodos para detalles).



0.25% Tween 20 y se volvieron a incubar con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa. Tras otra sucesión de lavados, se revelaron las membranas por quimioluminiscencia (*Amersham*). Tanto los anticuerpos primarios como secundarios fueron preparados en soluciones de 0.05 % Tween 20 – 0.3% BSA o 5 % leche desnatada en PBS. El origen y la dilución de uso de cada anticuerpo se resumen en la **tabla M1**.

4.2 Inmunoprecipitación de CHD6:

Los ensayos de inmunoprecipitación de CHD6 se realizaron utilizando un protocolo anteriormente descrito (*Lutz et al., 2006*). Se aplico tanto en células HEK293T sin transfectar o transfectadas con los correspondientes plásmidos, como en células HEK293T pseudo-infectadas o infectadas con virus VIC a alta MOI (3 PFU/cel). 24 horas después de la transfección, o 7 horas post-infección, las células fueron recogidas con tampón de lisis (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, Igepal 0.5%, nucleasa Benzonasa (*Novagen*) e inhibidores de proteasas (*Roche*)). Los lisados se preclarearon centrifugando 20 min a 13000 rpm a 4 °C, y el sobrenadante se incubó 2h a 4 °C en agitación suave con el anticuerpo anti-CHD6 (suero policlonal de *Bethyl Laboratories*) o un suero irrelevante como control. Posteriormente,

se incubaron con proteína A-Sefarosa (*Sigma*) durante 3h en las mismas condiciones. Después de lavar extensivamente con el tampón de lisis, el material unido se eluyó hirviendo la matriz en tampón Laemmli y se analizó por *Western blot*.

4.3 Ensayo de unión a péptidos sintéticos de histona 3 (*pull-down*):

Se partieron de núcleos de células HEK293T, infectadas o pseudo-infectadas, que se aislaron y purificaron como queda detallado en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos. Se lisaron los núcleos con tampón de lisis (50 mM Tris-HCl ph 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 % Igepal, 1 mM DTT, 10% Glicerol, nucleasa Benzonasa (*Novagen*) e inhibidores de proteasas (*Roche*)) y los extractos resultantes se preclarearon con resina de Avidina-monomérica de agarosa durante 2 h. Después, el material no unido fue incubado durante 10-12 h a 4 °C con resinas de Avidina-monomérica de agarosa acoplados a péptidos sintéticos biotinilados conteniendo los siguientes amino ácidos: aas 1-21 de la cola N-terminal de la histona 3 no metilado o tri-metilado en lisinas 4 y 9, y los aas 21- 44 de la cola N-terminal de la histona 3 no metilado o tri-metilado en lisina 27 (**Fig. M2-A**). Para cada ensayo de unión se utilizaron 4 µg de péptido y extracto celular procedente de 10<sup>7</sup> células. Tras el

Anticuerpo	Procedencia	Dilución
α-CHD6	Ratón	1:10
α-CHD3	Conejo	1:500
α-NP	Rata	1:4000
α-H3K4me3	Conejo	1:500
α-H3K9me3	Conejo	1:500
α-H3K27me3	Conejo	1:500
α-Ratón Alexa 488 (secundario)	Cabra	1:400
α-Conejo Alexa 647 (secundario)	Cabra	1:400
α-Rata Alexa 594 (secundario)	Cabra	1:400
DAPI		1:1000

**Tabla M2. Anticuerpos para Inmunofluorescencia.** Para cada uno de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunofluorescencia se indica el origen y la dilución empleados.

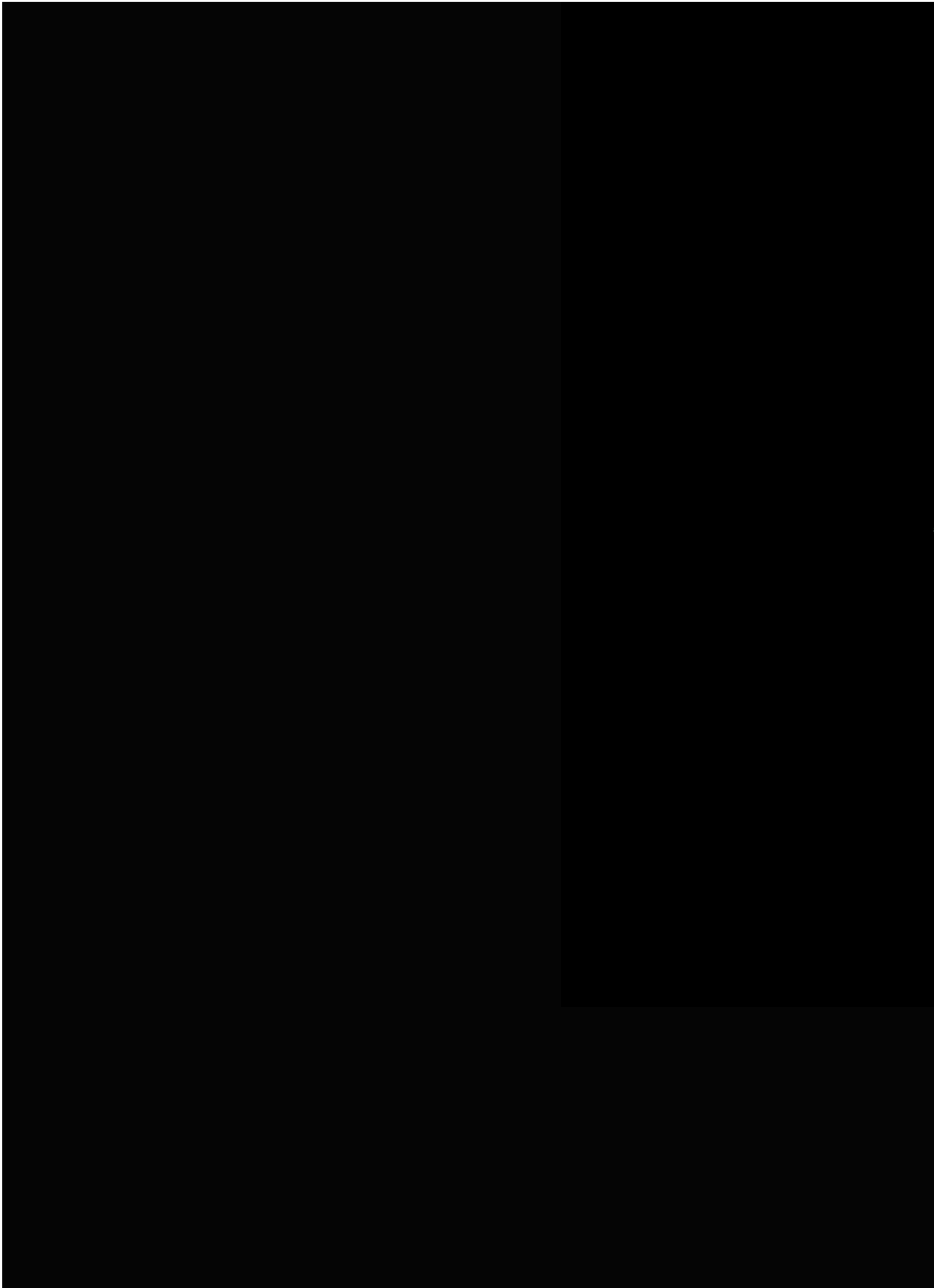
tiempo de unión las resinas se lavaron 7 veces con buffer de lavado (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM, 0.5 % Igepal e inhibidores de proteasas (Roche)) y las proteínas unidas se analizaron por *Western blot* (Fig. M2-B).

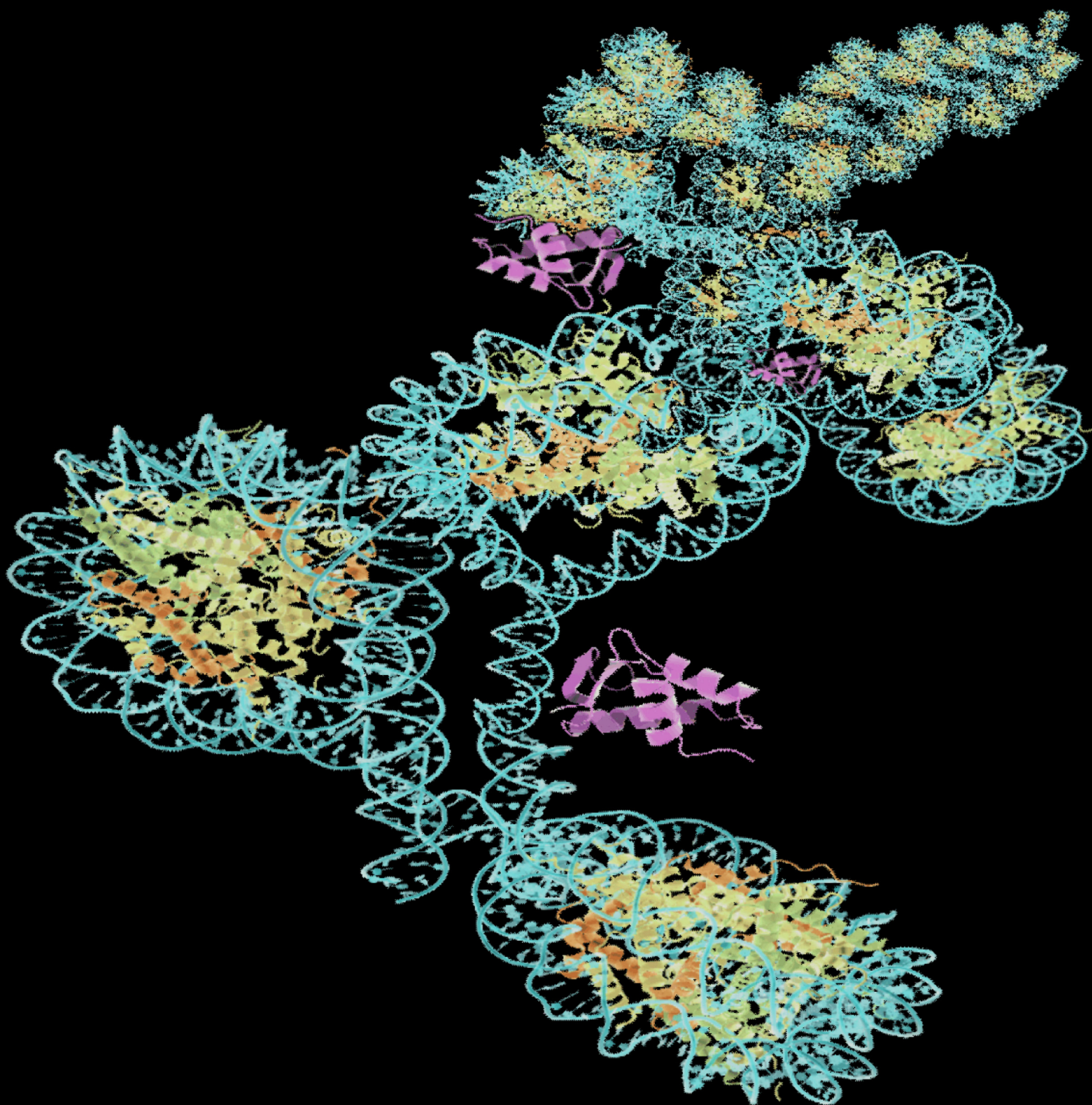
#### 4.4 Inmunofluorescencia:

Los ensayos de Inmunofluorescencia se realizaron en células A549 pseudo-infectadas o infectadas con virus Vic, y también en células pseudo-tratadas o tratadas durante 90 min con 50 µg/ml de actinomicina D y 100 µg/ml de Dicloro-beta-D-ribofuranosil bezimidazol (DRB), ambos preparados en DMSO. Las células se fijaron durante 20 min a temperatura ambiente con 3.7% formaldehído. Tras dos lavados con PBS, se permeabilizaron con 0.5% Tritón X-100 en PBS durante 5 min, se saturaron con PBS-3% BSA durante 30 min, y se incubaron durante 1 h con los correspondientes anticuerpos primarios preparados en PBS-0.1%BSA a las diluciones indicadas en la **Tabla M2**. Tras varios lavados con PBS, se incubaron durante 1 h con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a fluoróforos y preparados también en PBS-0.1%BSA. A ésta mezcla se añadió DAPI para detectar el DNA celular. Finalmente, las células se lavaron varias veces con PBS y las preparaciones

se montaron sobre portaobjetos con ProLong (Invitrogen). Las Inmunofluorescencia se analizaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot 200 equipado con una unidad confocal BioRad Radiance 2100 y utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 63 x 1.4. Se obtuvieron secciones ópticas de entre 0.2 y 0.3 µm utilizando el *software* LaserSharp v5.0 (BioRad), y se adquirieron secuencialmente imágenes de 1024 x 1024 píxeles para evitar efecto de *bleed-through*. Para los estudios de colocalización, secciones confocales individuales con 3-5 células de tres experimentos independientes fueron estandarizados para establecer la corrección de fondo (de 70-90 a 255 niveles de escala de grises para la señal de CHD6, de 80-90 a 255 niveles de escala de gris para la señal de NP viral, y de 110-120 a 252 niveles de escala de gris para H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3), fueron procesados con *software* LaserPix v.4 image (que es una adaptación para BioRad de ImagePro Plus, Media Cybernetics, LP) e imágenes binarias fueron obtenidas con máscara de colocalización que solo muestra píxeles solapantes. Los datos de los análisis cuantitativos se muestran como porcentaje del área estandarizada de la señal de CHD6 que solapa con el área estandarizada correspondiente para la señal de H3Kme3. Para el cálculo de medias, desviaciones estándar y significancia estadística, los valores se analizaron con la prueba de T de Student.







# RESULTADOS





# 1. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE CHD6 CON LA POLIMERASA VIRAL

El virus de la gripe presenta un reducido genoma de limitada capacidad codificante. Aunque en la última década se han estudiado extensivamente las funciones de las distintas proteínas virales, se sabe relativamente poco sobre los factores celulares implicados en el ciclo viral. Estudios recientes globales parecen confirmar el alto número de conexiones establecidas por el virus y destacan la importancia que estos factores celulares asociados podrían tener para el correcto desarrollo viral dentro de la célula (Watanabe et al., 2010). A pesar de los avances conseguidos recientemente, se desconocen las conexiones y las limitaciones que la polimerasa viral, como único responsable de la transcripción y replicación viral, afronta dentro del núcleo de la célula infectada. Una importante incógnita es conocer qué tipo de relación es la que el virus establece con la estructura nuclear mayoritaria: la cromatina celular. Evidencias ya indicadas en la introducción parecen sugerir que el virus de la gripe no permanece “oculto” frente a esta estructura. Es más, a pesar de que se han descrito interacciones directas con componentes de la cromatina, no sabemos si durante la infección se inducen cambios en las distintas regiones de la cromatina y si es capaz de alterar proteínas asociadas a esta estructura celular.

En estudios previos en nuestro laboratorio, se determinó la asociación del remodelador de cromatina ATP-dependiente CHD6 con la proteína PA de la polimerasa del virus de la gripe. La interacción se observó a través de un ensayo de doble híbrido en levadura usando PA como cebo (Huarte et al., 2001). Puesto que CHD6 es una proteína asociada a cromatina, y teniendo en cuenta lo poco que se conoce sobre esta estructura celular en relación al virus, decidimos ahondar en su estudio como factor asociado.

## 1.1 CHD6 y PB2 interaccionan *in vivo*

Una parte importante de las asociaciones a factores celulares descritas para el virus de la gripe corresponden a interacciones con las subunidades de la polimerasa viral, algo razonable teniendo en cuenta el gran número de complejas operaciones que se le han asignado. Modelos tridimensionales de la polimerasa viral conseguidos por microscopía electrónica indican una estructura

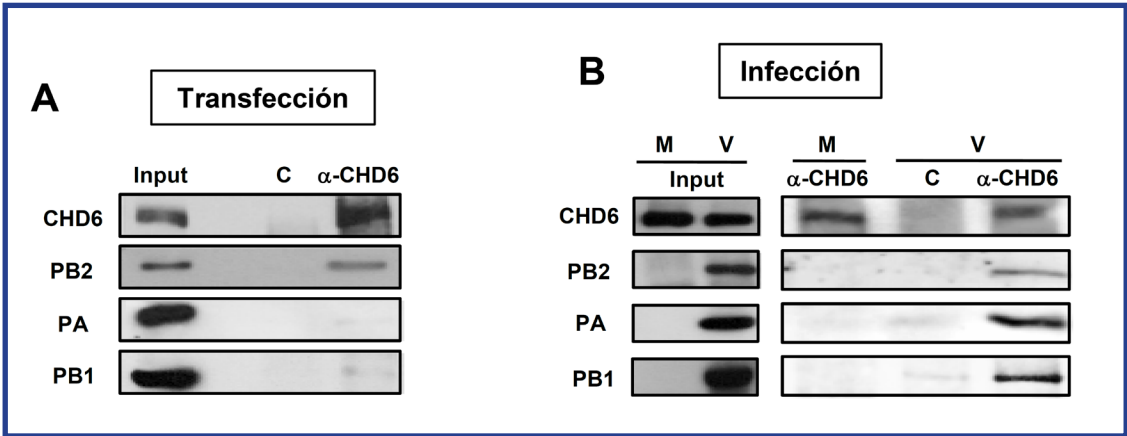
altamente compacta en la que las tres subunidades de la polimerasa viral se encuentran fuertemente asociadas (Area et al., 2004). Es por ello posible que CHD6 interaccione con alguna otra subunidad del heterotrímero, además de PA.

Para abordar esta posibilidad, se transfectaron las tres subunidades de la polimerasa del virus A/Victoria/3/75 (H3N2) (VIC) clonadas en plásmidos pCMV cuya expresión está dirigida por la RNA polimerasa II, y se prepararon extractos nucleares como se ha descrito en Materiales y Métodos. Como se puede ver en la **figura R1-A**, cuando se inmunoprecipita CHD6 utilizando un anticuerpo específico, se observa la co-precipitación de la subunidad PB2 de la polimerasa, pero no de las subunidades PA y PB1. PB2 es exclusivamente nuclear, pero tanto PA como PB1 muestran localización en ambos, citoplasma y núcleo celular (Fodor & Smith, 2004; Nieto et al., 1994). Como CHD6 es una proteína nuclear (Lutz et al., 2006), es posible que no se pueda detectar interacción entre CHD6 y PA debido a una insuficiente acumulación de PA expresada individualmente en el núcleo.

## 1.2 CHD6 interacciona con los complejos de las RNPs virales durante la infección

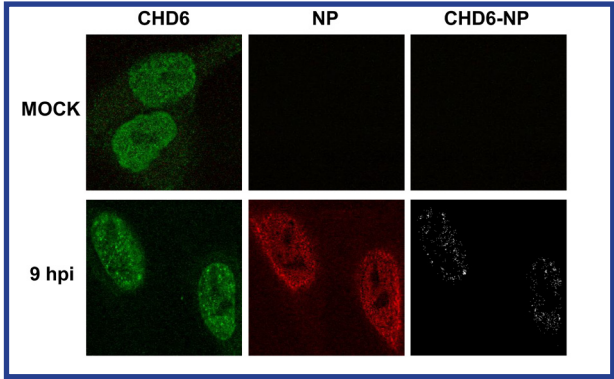
Hasta el momento tenemos datos que indican una interacción entre CHD6 y las subunidades PA y PB2 del virus de la gripe. A continuación se quiso saber si CHD6 interaccionaba con el complejo de la polimerasa viral durante la infección. Para ello se pseudo-infectaron o infectaron células HEK293T con virus VIC durante 6 h y los extractos nucleares se inmunoprecipitaron de forma específica con anti-CHD6 para ver su posible asociación con las subunidades de la polimerasa viral. En la **figura R1-B**, se observa co-inmunoprecipitación de todas las subunidades en comparación con lo que ocurre con el anticuerpo control utilizado, anticuerpo IgG de conejo. Por lo tanto, CHD6 interacciona con PA y PB2 de forma individual y con el complejo de la polimerasa viral en células infectadas.

El RNA genómico del virus de la gripe (vRNA), al igual que el cRNA, se encuentran en forma de complejos ribonucleoproteicos (RNPs) y no como RNAs desnudos. Las RNPs están constituidas por la asociación de la polimerasa



**Figura R1. Análisis de la interacción de CHD6 con proteínas de la polimerasa del virus de la gripe. (A)** Células HEK293T fueron transfectadas, de forma separada, con plásmidos que expresan las subunidades PA, PB1 o PB2. 24 horas post-transfección se recogieron las células, se prepararon extractos nucleares, y fueron sometidos a ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-CHD6 (α-CHD6) o una IgG de conejo irrelevante utilizado como control (C). Tanto los extractos nucleares de partida (Input) como las fracciones inmunoprecipitadas se resolvieron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y se analizaron por *Western blot* utilizando los anticuerpos contra CHD6, PB2, PA y PB1. **(B)** Igual que (A) pero utilizando como extracto nuclear células HEK293T pseudo-infectadas (M) o infectadas con la cepa VIC a una MOI de 3 PFU/célula (V). Las células fueron recogidas y procesadas a 6 horas post-infección.

viral con múltiples monómeros de la proteína NP, que recubren estos RNAs virales (Elton, 2005b). Quisimos saber si CHD6 se asocia con las RNPs en el núcleo y para ello realizamos ensayos de colocalización por Inmunofluorescencia entre CHD6 y NP, como componente mayoritario de los complejos de RNPs virales. Utilizando para el ensayo células A549 infectadas durante 6 h, en la **figura R2** se puede apreciar un alto grado de colocalización entre ambas proteínas, sugiriendo la asociación de CHD6 con los complejos de RNPs.



**Figura R2. Colocalización de CHD6 y NP en el núcleo de células infectadas.** Células A549 fueron pseudo-infectadas o infectadas con virus VIC a una MOI de 3 PFU/cel. A 9 horas post-infección (hpi), las células fueron fijadas y procesadas para microscopía de inmunofluorescencia confocal contra las proteínas CHD6 (verde) y NP (rojo). Los paneles CHD6-NP muestran la señal común a ambos anticuerpos. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.



## 2. ESTUDIO DE LA RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA CELULAR CHD6 EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE

Los datos de asociación indicados en el punto anterior sugieren la participación funcional de CHD6 en el ciclo infectivo del virus de la gripe. Para conocer si en efecto esto es así, realizamos diversos ensayos analíticos de carácter funcional en células silenciadas para CHD6.

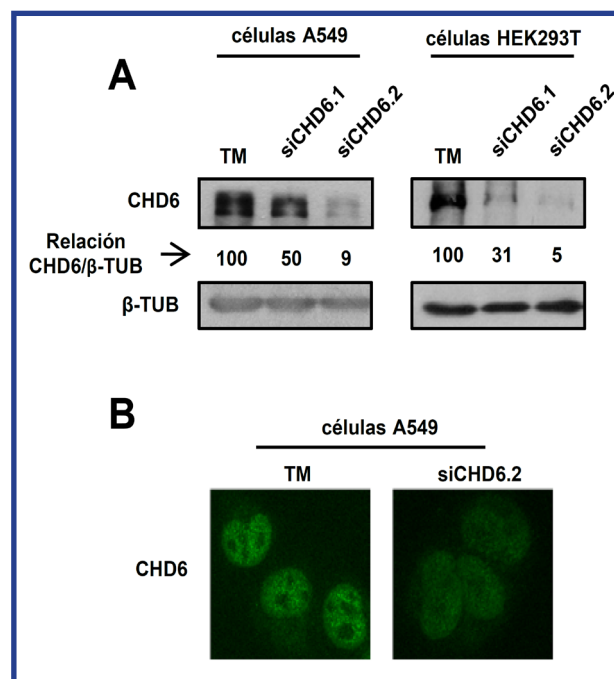
### 2.1 Construcción de células HEK293T y A549 CHD6 silenciadas

Para abordar el silenciamiento de la proteína CHD6 recurrimos a la utilización de la técnica de RNA interferente basado en el sistema de expresión de shRNA por medio del uso del plásmido pSuper.retro.puro (Oligoengine). Las dos secuencias diana seleccionadas contra el RNA mensajero de CHD6 corresponden a una región con baja similitud de secuencia con otros miembros CHD próximos (CHD7-9 subfamilia III). La ventaja de utilizar plásmidos con capacidad de expresión de shRNAs es la posibilidad de generar líneas celulares estables con una permanente reducción en los niveles de la proteína en estudio. Esto es posible siempre y cuando la reducción de la proteína en concreto no comprometa la viabilidad de las células. Un importante beneficio del uso de células establemente silenciadas frente a los ensayos de silenciamiento transitorios es la posibilidad de ser utilizadas sin tener que comprobar o hacer supuestos sobre la eficacia en la capacidad de silenciamiento en cada ensayo. Por ello, se generaron líneas celulares humanas establemente silenciadas transfectando los plásmidos de silenciamiento de CHD6 (pSR.puro.siCHD6.1 y .siCHD6.2) en los tipos celulares A549 y HEK293T, y seleccionando con antibiótico puromicina a concentraciones de 0.5 µg/ml y 2.5 µg/ml, respectivamente. Como líneas celulares control se transfeció, en paralelo y en los mismos tipos celulares de origen, el plásmido pSR.puro.Tm, que expresa shRNAs sin diana frente a ningún mensajero celular humano. Como se puede observar en la **figura R3-A**, los niveles de proteína CHD6 en las distintas líneas celulares establemente silenciadas es claramente inferior a las correspondientes células control Tm. Los niveles de reducción de proteína CHD6 se correlacionan con los observados en ensayos en los que se transfecaron las construcciones de silenciamiento

de forma transitoria (datos no mostrados). Mientras que el silenciador siCHD6.1 redujo los niveles de acumulación de CHD6 hasta un 30-50% respecto al control, siCHD6.2 redujo estos niveles hasta un 5-10 %. Adicionalmente, se pudo observar una menor detección de señal CHD6 por microscopía de Inmunofluorescencia en células A549-siCHD6.2 con respecto a la detectada en A549-TM (**Fig. R3-B**).

### 2.2 La actividad de las RNPs virales aumenta en células con niveles de CHD6 reducidos

Como primer ensayo funcional dirigido al estudio de la posible implicación de la proteína celular CHD6 en el ciclo infectivo del virus de la

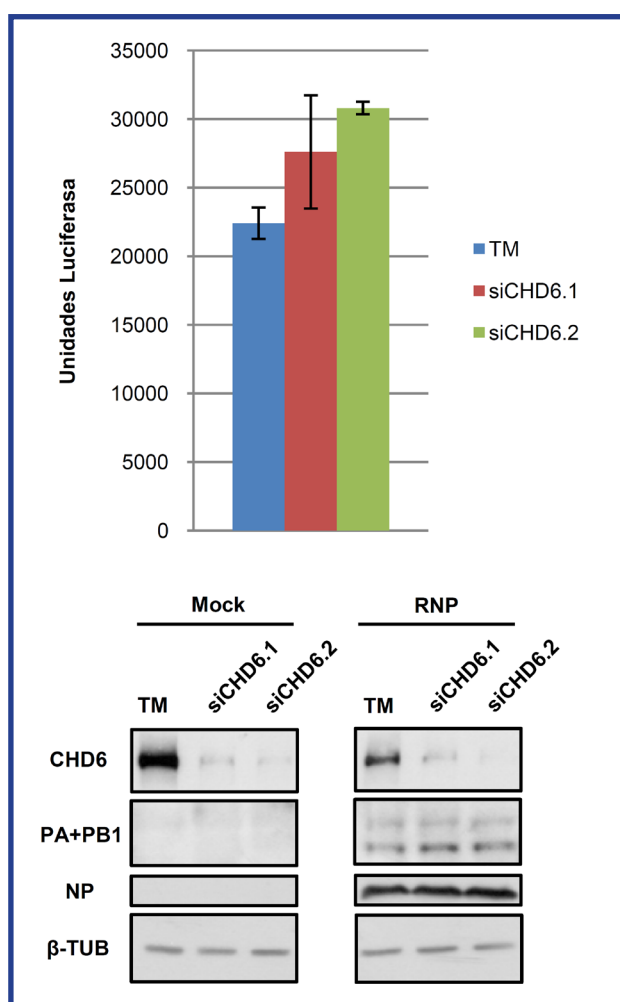


**Figura R3. Construcción de líneas celulares A549 y HEK293T silenciadas para la proteína CHD6.** (A) Células A549 y HEK293T fueron transfecadas con los plásmidos que expresan un RNAi de secuencia diana no específica (TM) o secuencias RNAi silenciadoras del mensajero del gen CHD6 (siCHD6.1 y siCHD6.2). El nivel de acumulación de CHD6 fue evaluado por *Western blot*, al igual que el de β-tubulina utilizado como control de carga. (B) Detección de proteína CHD6 por microscopía de Inmunofluorescencia confocal en los clones A549-TM y A549-siCHD6.2.

gripe, analizamos si la actividad de replicación y transcripción viral de los complejos de RNPs se encuentra afectada en células CHD6 silenciadas. Para ello, se realizaron ensayos de reconstitución de RNPs en presencia de molde pHH-NS-luciferase como queda detallado en la sección 2.4 de Materiales y Métodos. En estos ensayos la actividad enzimática de las RNPs viene dada por la cantidad de proteína luciferasa producida en cada condición (ver **Fig. M1**). Las transfecciones de los plásmidos necesarios para la reconstitución se realizaron en células HEK293T control y CHD6 silenciadas ya que son las que poseen un mayor rendimiento de transfección. En el gráfico de la **figura R4** se aprecia como la actividad luciferasa registrada en las líneas celulares CHD6 silenciadas es entre

un 20-35% superior a la obtenida para las células control. No se obtuvo actividad luciferasa cuando se transfectaron en cada línea celular los plásmidos necesarios para la expresión de las proteínas de la polimerasa y NP, pero no el molde pHH-NS-luciferase. También se muestra por *Western blot* que la acumulación de las proteínas PA, PB1 y NP no varía entre las líneas celulares, por lo que la diferencia en actividad observada no responde a diferencias en la acumulación de los componentes de las RNPs.

Este resultado indica que una menor disminución del remodelador de cromatina ATP-dependiente CHD6 aumenta ligeramente la actividad de las RNPs del virus de la gripe.

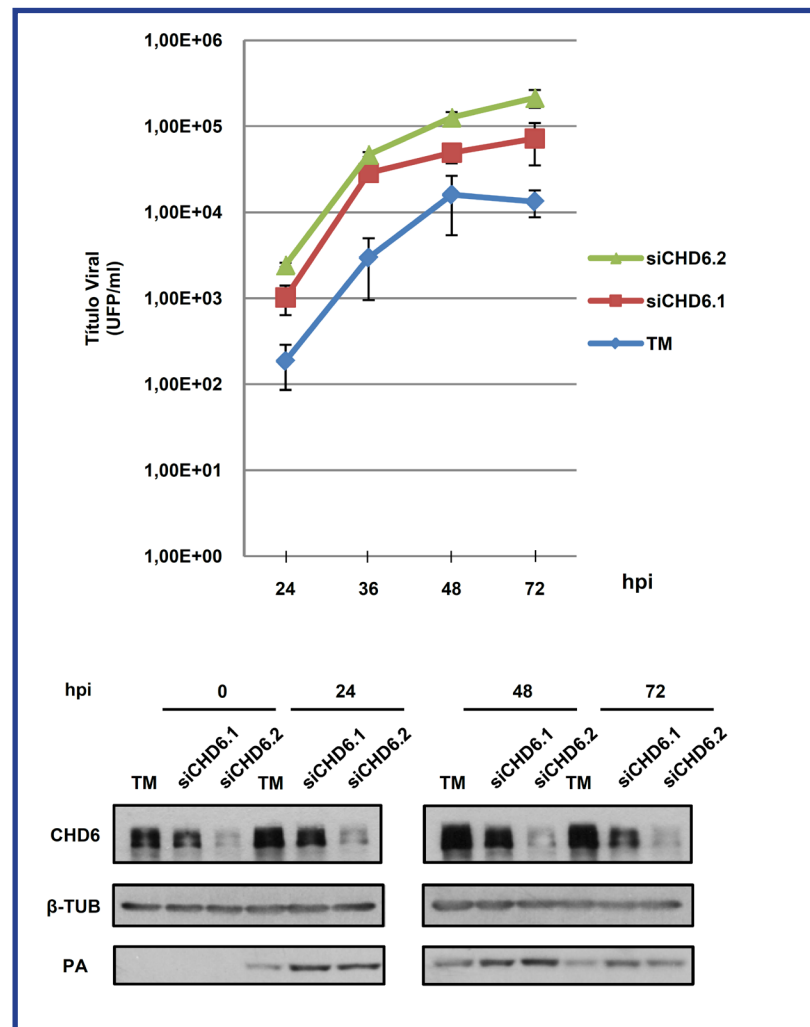


**Figura R4. Determinación de la actividad de RNPs virales en células silenciadas para CHD6.** Células HEK293T-TM, -siCHD6.1 y -siCHD6.2 fueron transfectadas para la realización de ensayos de reconstitución de RNPs y medida de actividad luciferasa, tal como queda detallado en Materiales y Métodos. El gráfico de la parte superior muestra la actividad luciferasa medida por luminómetro. En la parte inferior se muestra la acumulación de las proteínas indicadas analizadas por *Western blot*.

### 2.3 Niveles bajos de CHD6 aumentan la acumulación de partículas virales de la gripe en infecciones a baja multiplicidad

El aumento de la actividad de las RNPs observado en células con CHD6 silenciada, podría traducirse en una mayor producción de partículas virales progenie durante la infección. Para abordar este supuesto, se realizaron cinéticas de acumulación de partículas virales infectivas producidas en las líneas A549 estables control y CHD6 silenciadas. Se eligió el tipo celular A549, línea de carcinoma epitelial de pulmón humano, por representar un tipo celular próximo al infectado por gripe en humanos. También se hizo un seguimiento de la cantidad de proteínas virales generada dentro de las células infectadas. Los ensayos se hicieron a multiplicidad de infección baja ( $10^{-3}$  PFU/célula) y se utilizó un virus recombinante con los segmentos genómicos de PA, PB1, PB2 y NP, pertenecientes a la cepa viral VIC, y el resto de segmentos de la cepa WSN. Este virus presenta las subunidades genómicas HA y NA de la cepa WSN y, por lo tanto, no precisa de tripsina exógena para la liberación de las partículas virales unidas a la membrana de la célula infectada.

En infecciones a baja multiplicidad se mide el crecimiento viral en múltiples rondas o ciclos infectivos. Para llevar a cabo este tipo de ensayos, se infectaron las líneas celulares A549 control o establemente silenciadas para la proteína CHD6 a una multiplicidad de infección de  $10^{-3}$  PFU/cel, y se realizó un seguimiento de acumulación de partículas virales durante la infección hasta las 72 h post-infección. En la gráfica de la **figura R5** se puede apreciar como el crecimiento del virus es mayor en las células CHD6 silenciadas que en células control (TM). Por *Western blot* se confirmó



**Figura R5. Análisis del crecimiento viral en infecciones a baja MOI de células silenciadas para CHD6.** Células A549 control (-TM), o silenciadas para CHD6 (-siCHD6.1 y -siCHD6.2) fueron infectadas, a una MOI de  $10^{-3}$  PFU/cel, con un virus recombinante independiente de tripsina que contiene los segmentos genómicos PA, PB1, PB2 y NP procedentes de la cepa VIC y el resto de segmentos procedentes de la cepa WSN. A los tiempos indicados en la gráfica se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó el título viral. Las imágenes de *Western blot* indican los niveles de acumulación de las proteínas CHD6, PA y  $\beta$ -tubulina a 0, 24, 48 y 72 horas post-infección (hpi).

el correcto silenciamiento de CHD6 de las líneas estables a lo largo de toda la cinética. Es de notar que el mayor título obtenido ocurre en la línea celular A549-siCHD6.2, que presenta un mayor grado de silenciamiento y, por lo tanto, un menor nivel de proteína CHD6. La diferencia ya es visible a 24 h post-infección y ésta llega a alcanzar las 5 veces, en el caso de siCHD6.1, y las 10 veces para siCHD6.2. La acumulación de proteína viral en

células infectadas a baja multiplicidad también fue analizado por *Western blot*. Como se puede observar en la **figura R5**, la acumulación de la subunidad PA del virus de la gripe es mayor en células con niveles bajos de CHD6, confirmando que la mayor acumulación de virus en el sobrenadante es como resultado de una mayor expresión génica en éstas células.

### 3. ESTUDIO DEL EFECTO QUE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE TIENE SOBRE LA PROTEÍNA CELULAR CHD6

A pesar del estricto requerimiento funcional que la polimerasa del virus de la gripe establece con la maquinaria transcripcional celular, nuestro laboratorio y otros grupos han demostrado que a tiempos intermedios del ciclo infectivo se induce la degradación de RNAPII (Rodríguez et al., 2009; Rodríguez et al., 2007; Vreede et al., 2010). Esto concuerda con la menor actividad de transcripción mediada por la polimerasa celular también a partir de tiempos intermedios de infección. Además, se ha sugerido que la interacción que establece la polimerasa viral con el dominio carboxilo-terminal de la subunidad mayor de la RNAP II, independientemente de permitir una conexión funcional evidente, podría ser también responsable de su degradación final (Engelhardt et al., 2005; Vreede et al., 2010). El resultado final sugiere un nuevo mecanismo que se incluye dentro del amplio repertorio utilizado por el virus de la gripe para “desmantelar” la respuesta antiviral de la célula huésped.

Teniendo en cuenta que: 1) estudios previos en nuestro laboratorio muestran la colocalización de la proteína CHD6 con las formas hipo- e hiper-fosforiladas de la RNAP II, además de estar presente en sitios de síntesis de mRNAs celulares (Lutz et al., 2006), 2) el virus de la gripe interacciona con la forma hiper-fosforilada y termina degradando ambas formas (hipo- e hiper-fosforiladas) de la RNAP II, 3) el complejo de la RNA polimerasa de gripe interacciona con CHD6, y 4) CHD6 es un modulador negativo de la infección que impide el correcto progreso del ciclo viral en la célula huésped, analizamos si durante la infección por el virus de la gripe se produce algún cambio en la proteína CHD6 y si, al igual que la RNAP II, es también objeto del proceso de degradación llevado a cabo por la polimerasa viral.

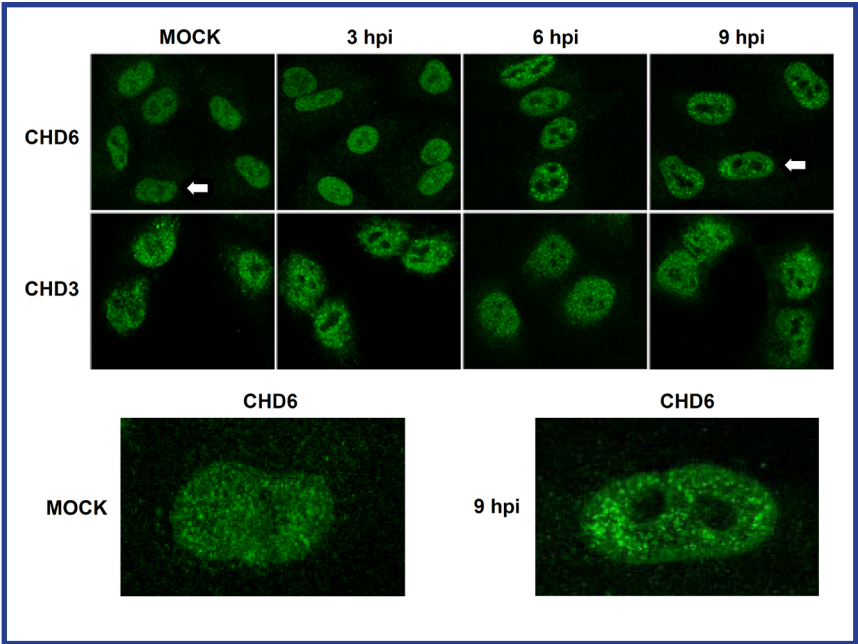
#### **3.1 La distribución intranuclear de CHD6 cambia durante la infección**

Inicialmente se analizó si la distribución de CHD6 en el núcleo celular variaba durante la infección. Estudios previos determinaron la localización nuclear de CHD6 en condiciones normales y se pudo observar exclusivamente en el nucleoplasma y con una distribución uniforme de patrón granular (Lutz et al., 2006). Para realizar los ensayos de Inmunofluorescencias, se utilizó un

anticuerpo comercial monoclonal específico contra CHD6 (*Abcam*). La validación de este anticuerpo para su uso en Inmunofluorescencia fue doble: 1) en Inmunofluorescencias contra CHD6 realizadas en las líneas A549-TM control y A549-siCHD6.2 silenciada estables, el anticuerpo mostró una menor acumulación de CHD6 en las células silenciadas, y 2) el patrón de CHD6 detectado con éste anticuerpo fue similar al ya observado con anterioridad (**Fig. R3-B**).

A continuación, células A549 fueron pseudo-infectadas o infectadas con virus VIC a alta multiplicidad de infección (3 PFU/cel) y se realizaron Inmunofluorescencias contra CHD6 y CHD3. CHD3 pertenece a la segunda subfamilia de remodeladores de cromatina y forma parte de los complejos represores NuRD con actividad deacetilasa asociada (Tong et al., 1998; Xue et al., 1998). Fue utilizada como proteína no relacionada y empleada como control en éste y otros ensayos posteriores. Como se puede observar en la **figura R6**, la distribución de CHD3 no parece alterarse a 3, 6 y 9 h post-infección con respecto a la observada en células pseudo-infectadas. Sin embargo, se observa un cambio en la distribución intranuclear de CHD6 siendo evidente a las 6 h post-infección. La distribución uniforme descrita en condiciones normales da paso a una distribución con un patrón más granulado excluido de los nucléolos (**Fig. R6**).

La infección por el virus de la gripe produce importantes cambios en la maquinaria de transcripción celular resultando en la degradación de RNAP II y la inhibición de la transcripción celular (Chandy et al., 2006; Rodríguez et al., 2009; Rodríguez et al., 2007; Vreede & Fodor, 2010). Por lo tanto, se estudió si los cambios en la distribución de la proteína CHD6 eran consecuencia de ésta inhibición o debido a alteraciones específicas inducidas en la célula huésped durante la infección. Para distinguir entre estas dos posibilidades se trataron células no infectadas con distintas drogas que causan inhibición de la transcripción, y se analizaron posibles cambios en la distribución de CHD6. Se llevaron a cabo ensayos con dos drogas distintas: 1) actinomicina D que inhibe la elongación de la síntesis de RNA (Sehgal et al., 1976), y 2) DRB que es un análogo de adenosina, produce la terminación de la transcripción de forma prematura y es un inhibidor reversible (Clement & Wilkinson, 2000; Egyhazi, 1976). Como se puede observar en la **figura R7-A**, ninguna de estas drogas cambia la

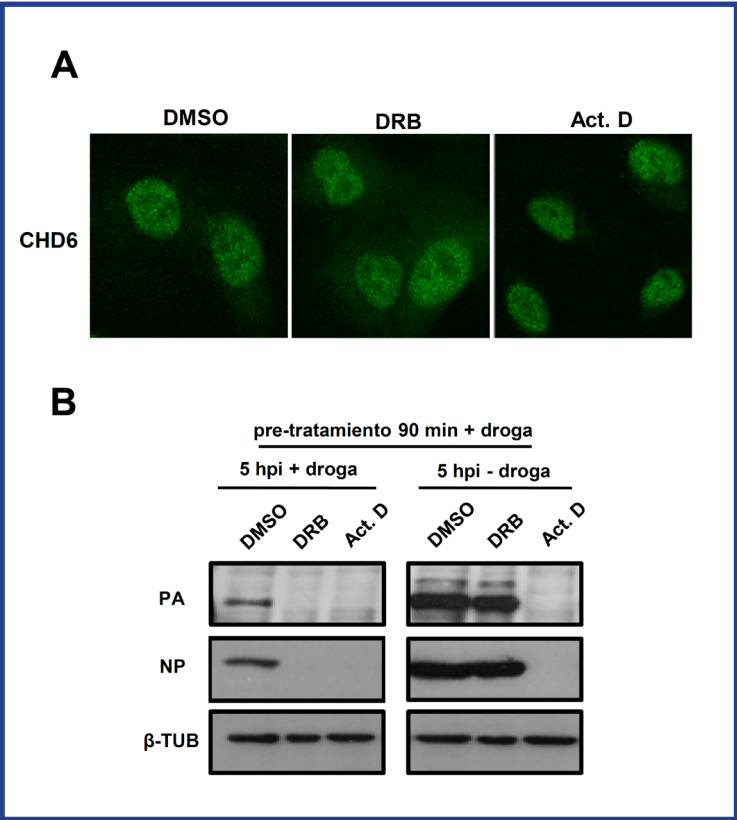


**Figura R6. Cambios en la distribución intranuclear de CHD6 durante la infección por el virus de la gripe.** Células A549 fueron pseudo-infectadas o infectadas con virus VIC a una MOI de 3 PFU/cel. A los tiempos indicados post-infección (hpi) se fijaron las células y se procesaron para llevar a cabo análisis de microscopía de Inmunofluorescencia confocal en donde se usaron anticuerpos específicos contra las proteínas CHD6 y CHD3. Los paneles inferiores muestran una visión magnificada de las células marcadas con una flecha.

distribución intranuclear de CHD6 indicando, por lo tanto, que las alteraciones observadas durante la infección son debidas a cambios específicos inducidos durante la infección. Para controlar la efectividad de las drogas empleadas, se analizó la susceptibilidad de células tratadas a la infección por el virus de la gripe. Utilizamos esta aproximación teniendo en cuenta la dependencia de la transcripción viral por la transcripción mediada por la RNPA II y, por consiguiente, la eficacia de estas

drogas en la inhibición de la replicación viral (Tamm et al., 1954; Vogel & Scholtissek, 1995). Células A549 fueron tratadas con las drogas durante 90 min y, después, infectadas durante 5 horas con o sin droga. La acumulación de proteínas virales se evaluó por *Western blot* (Fig. R7-B). Como se puede observar, la presencia de actinomicina D o DRB durante la infección (Fig. R7-B, 5hpi + droga) inhibe totalmente la acumulación de proteínas virales. Cuando se retira el inhibidor reversible

**Figura R7. Estudio de la contribución de la inhibición transcripcional en el cambio en la distribución intranuclear de CHD6.** (A) Células A549 fueron tratadas con DMSO, actinomicina D o DRB a las concentraciones indicadas en el apartado 4.4 de Materiales y Métodos. Tras 90 minutos de tratamiento, las células fueron fijadas y procesadas para realizar análisis de microscopía de Inmunofluorescencia confocal con anticuerpo contra la proteína CHD6. (B) Células del apartado (A) pseudo-tratadas (DMSO) o tratadas con drogas durante 90 minutos, fueron infectadas con virus VIC durante 5 horas con (5hpi + droga) o sin (5hpi - droga) tratamiento adicional con droga. La acumulación de las proteínas virales PA y NP, junto al control de carga  $\beta$ -tubulina, fue analizado por *Western blot*.





DRB después de los 90 min de pre-tratamiento antes de la infección (**Fig. R7-B, 5hpi - droga**), la transcripción viral tiene lugar. Por lo tanto, estos resultados muestran el correcto funcionamiento de las drogas actinomicina D y DRB en el bloqueo de la actividad mediada por la RNAP II, e indica que se requiere infección viral para que se puedan observar cambios en la distribución intranuclear de CHD6.

### 3.2 La infección por el virus de la gripe provoca la degradación de CHD6

Analizamos a continuación si CHD6 es objeto de degradación durante la infección con el virus de la gripe. Para ello infectamos células A549 con el virus VIC a alta multiplicidad y analizamos los niveles de acumulación de CHD6 a lo largo de la infección. En la **figura R8-A** se ve por *Western blot* como, a partir de 6 h post-infección, la cantidad de CHD6 disminuye progresivamente hasta alcanzar niveles, a 12 h post-infección, de entre 20-40% relativo a la cantidad de CHD6 en células pseudo-infectadas. Los ensayos se realizaron tanto en células A549 como en HEK293T con idénticos resultados (solo se muestran ensayos hechos con células A549). En el mismo ensayo se observa que la cantidad de CHD3 no varía durante la infección.

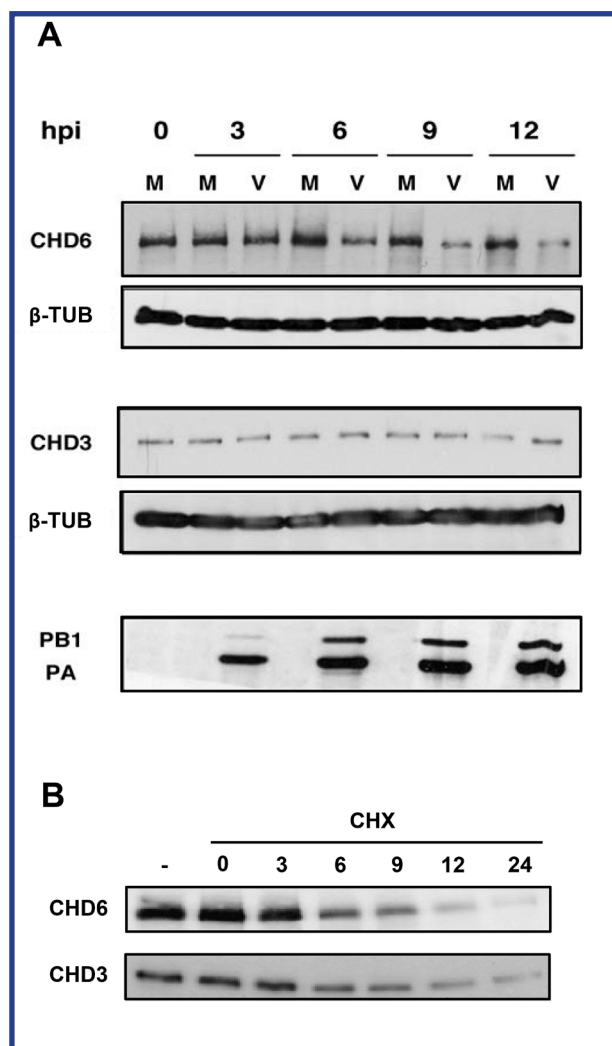
Es ampliamente conocido que durante la infección por el virus de la gripe se produce un importante parada en la expresión de proteínas celulares (proceso conocido como shut-off celular) (Aragón et al., 2000; Garfinkel & Katze, 1993). Debido a esto, la acumulación de determinadas proteínas puede disminuir durante la infección viral, siendo esta disminución particularmente importante para el caso de mRNAs poco estables o proteínas de vida media corta. Para descartar esta posibilidad en la desaparición de proteína CHD6 durante la infección, se analizaron las vidas medias de CHD6 y CHD3. Se trataron células A549 con cicloheximida para bloquear la traducción de proteínas celulares

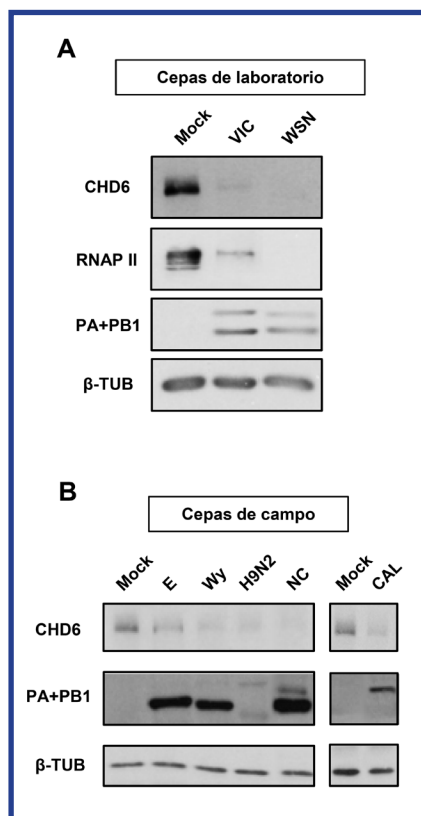
y, después, se recogieron muestras a diferentes tiempos que fueron analizadas por *Western blot*. La vida media de ambos remodeladores de cromatina es de entre 6-9 horas (**Fig R8-B**). Puesto que los niveles de proteína de CHD6 disminuyen a partir de 6 h post-infección, y teniendo en cuenta que CHD3 no disminuye durante las 12 horas de infección, la disminución observada no es consecuencia del bloqueo en la síntesis de proteínas celulares producido por la infección.

#### 3.2.1 CHD6 es degradada en infecciones tanto por cepas de laboratorio como por cepas naturales del virus de la gripe

Estudios previos en nuestro laboratorio indicaron que el proceso de degradación de la RNAP II ocurre no solo en infecciones con virus de laboratorio, sino también en infecciones con cepas naturales de distinto origen (Rodríguez et al., 2009). Para conocer si la degradación de CHD6 observada es un fenómeno general o exclusivo

**Figura R8. Degradación de CHD6 durante la infección por el virus de la gripe. (A)** Células A549 fueron pseudo-infectadas o infectadas con virus VIC a una MOI de 3 PFU/cel. A distintas horas post-infección (hpi), se obtuvieron extractos celulares y se analizó la cantidad de CHD6 y CHD3 por *Western blot*. Las acumulaciones de  $\beta$ -tubulina y PA/PB1 virales fueron estudiadas en paralelo como controles de carga y progresión viral, respectivamente. **(B)** Determinación de las vidas medias de CHD6 y CHD3. Células A549 sin tratar o tratadas con cicloheximida (CHX) a una concentración de 100  $\mu$ g/ml fueron recogidas a los tiempos indicados. Se analizó la cantidad de proteínas resolviendo las muestras en un gel de SDS-poliacrilamida y realizando *Western blot* contra las proteínas CHD6 y CHD3.





**Figura R9. Degradación de CHD6 en infecciones con cepas virales de laboratorio y aislados naturales.** (A) Células A549 fueron pseudo-infectadas (MOCK) o infectadas con distintas cepas del virus de la gripe a una MOI de 3 PFU/cel. Después de 15 horas de infección con las cepas de laboratorio A/Victoria/3/75 (H3N2) (VIC) y A/WSN/33 (H1N1) (WSN), se recogieron las células y se determinó la cantidad de proteína CHD6, RNAP II, PA + PB1 virales y  $\beta$ -tubulina por ensayo de *Western blot*. (B) Similar a la parte (A) con células infectadas con las cepas naturales A/England/1/51 (H1N1) (E), A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (NC), A/Wyoming/3/2003 (H3N2) (Wy), A/Turkey/Wisconsin/66 (H9N2) y A/California/07/09 (H1N1) (CAL). Se recogieron las células y se analizó la acumulación de las proteínas indicadas.

de cepas de virus de una determinada naturaleza, se realizaron experimentos de infección a alta multiplicidad utilizando cepas virales de diverso origen. Para ello, se infectaron A549 con la cepa de laboratorio A/WSN/33 (WSN) y con diferentes aislados naturales del subtipo H1N1 (A/England1/51 y A/New Caledonia/20/99) y del subtipo H3N2 (A/Wyoming/3/2003). Adicionalmente, se incluyó en éste análisis infecciones con el virus aviar A/Turkey/Wisconsin/66 (H9N2) y el virus de origen porcino A/California/07/09 (H1N1), con el objetivo de determinar si la degradación observada ocurre también en infecciones con un virus aviar y con virus de origen porcino responsable de la reciente pandemia de 2009, respectivamente. En todos los casos, la acumulación de CHD6,  $\beta$ -tubulina y las subunidades PB1 y PA se analizaron a las 15 h

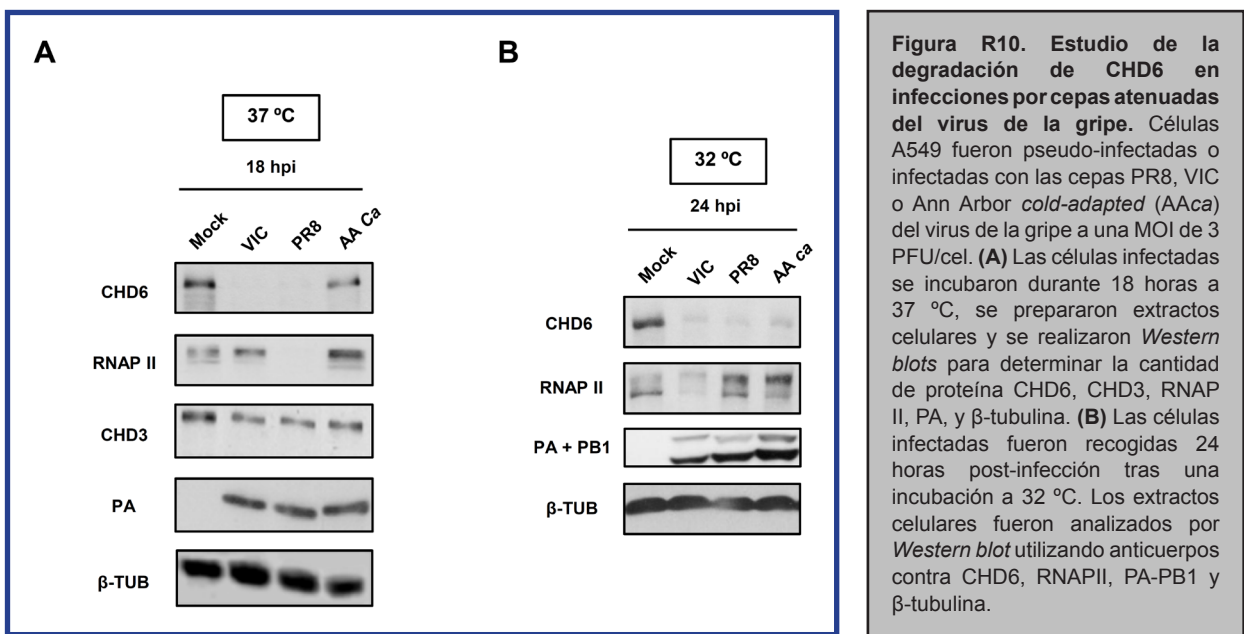
post-infección por *Western blot*. En la figura R9 se observa que tanto WSN como los aislados humanos producen un nivel de degradación de CHD6 similar, lo cual apoya que la degradación de CHD6 sea una característica general de virus de la gripe tipo A. Como ya se ha descrito anteriormente, las proteínas PA de origen aviar (ver líneas H9N2 y CAL) no son detectables por *Western blot*, probablemente por tener ausente el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal que se ha utilizado en éste ensayo (Rodríguez et al., 2009).

### 3.2.2 Cepas atenuadas del virus de la gripe también degradan CHD6

Las cepas atenuadas del virus de la gripe no degradan la RNAP II (Rodríguez et al., 2009). Esto ha llevado a proponer que la capacidad por parte del virus de la gripe de degradar la RNAP II e inhibir su actividad transcripcional, pudiera contribuir a su virulencia. Para conocer si la degradación de CHD6 ocurre en infecciones con cepas atenuadas vacunales del virus de la gripe, se infectaron a alta multiplicidad de infección células A549 con los virus: VIC utilizado como virus control, y las cepas atenuadas A/PR/8/34 (PR8), y cold adapted A/Ann Arbor/6/60 (AAca). La cepa AAca es una cepa que ha sido adaptada a multiplicarse a bajas temperaturas (Maassab, 1967). Por este motivo, las células infectadas se incubaron tanto a 37 °C como a 32 °C y se analizaron por *Western blot* los niveles de CHD6, CHD3 y de la forma hipo-fosforilada de la RNAP II. La correcta progresión de los virus se analizó midiendo la acumulación de proteína viral PA, mientras que  $\beta$ -tubulina se utilizó como control negativo. En la figura R10-A se observa como la degradación de CHD6 es obvia, con cantidades de proteína prácticamente indetectables, a 37 °C para las infecciones con los virus VIC y con la cepa atenuada vacunal PR8. Esta disminución es ligeramente inferior a 32 °C (Fig.R10-B). La infección con la cepa atenuada, AAca, produce una ligera disminución en los niveles de CHD6 a 37 °C, y alcanza un 50% de reducción con respecto a los niveles de pseudo-infección a 32 °C. Como ya se ha mencionado, la degradación de la RNP II es visible en infección por VIC, pero no ocurre con las dos cepas atenuadas. Los niveles de CHD3 no parecen variar significativamente en ningún caso.

Por lo tanto, y al contrario de lo que ocurre con la RNAP II, CHD6 es degradado también por cepas de virus atenuadas vacunales, aunque en la infección por AAca la capacidad de degradación es sensiblemente menor.



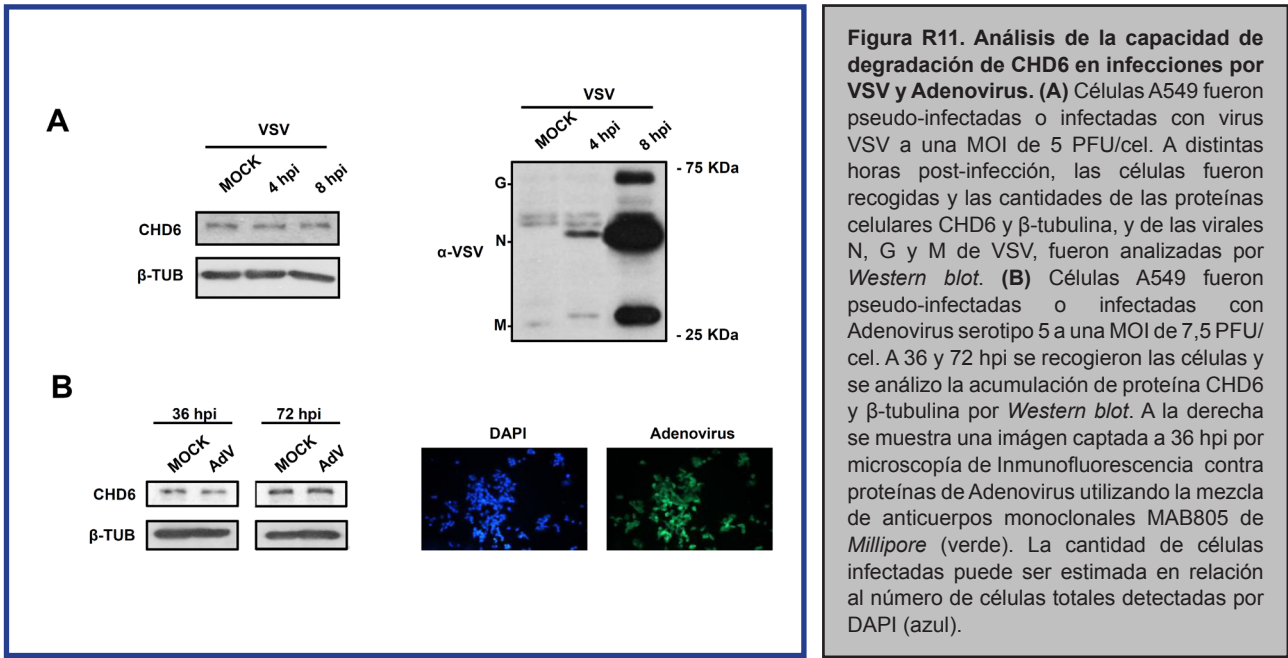


**Figura R10. Estudio de la degradación de CHD6 en infecciones por cepas atenuadas del virus de la gripe.** Células A549 fueron pseudo-infectadas o infectadas con las cepas PR8, VIC o Ann Arbor *cold-adapted* (AAca) del virus de la gripe a una MOI de 3 PFU/cel. **(A)** Las células infectadas se incubaron durante 18 horas a 37 °C, se prepararon extractos celulares y se realizaron *Western blots* para determinar la cantidad de proteína CHD6, CHD3, RNAP II, PA, y β-tubulina. **(B)** Las células infectadas fueron recogidas 24 horas post-infección tras una incubación a 32 °C. Los extractos celulares fueron analizados por *Western blot* utilizando anticuerpos contra CHD6, RNAPII, PA-PB1 y β-tubulina.

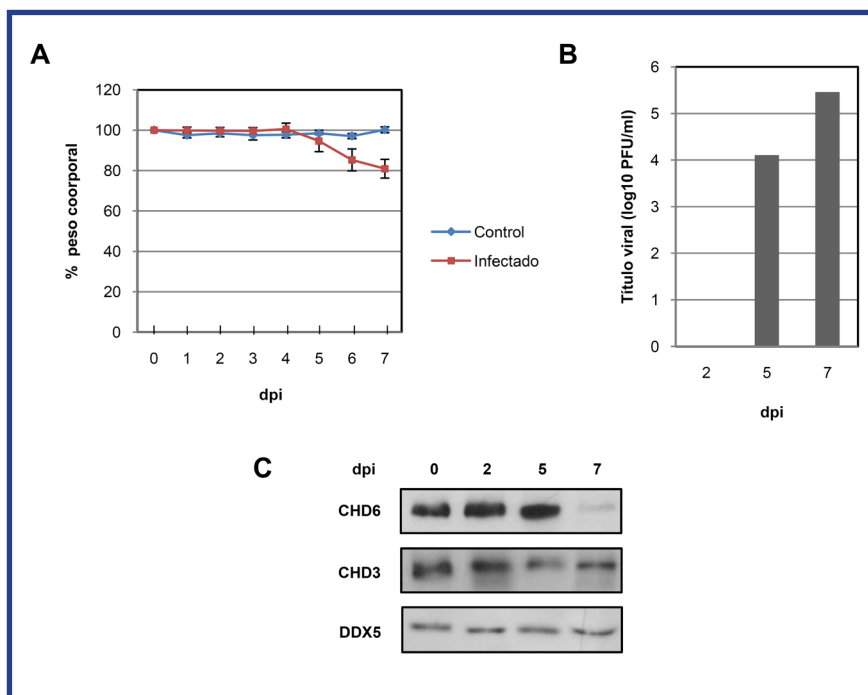
### 3.2.3 Infecciones con adenovirus y VSV no producen degradación de CHD6

Debido a que se observa siempre, con mayor o menor grado, degradación de la proteína CHD6 en infecciones con todas las cepas del virus de la gripe probadas, analizamos a continuación si esta degradación es específica del virus de la gripe o también ocurre con otras familias de virus. Se infectaron células A549 con otros dos virus no relacionados que también son patógenos en humanos y que presentan ciertas similitudes con el virus de la gripe. Por un lado se utilizó el virus de la estomatitis vesicular (VSV). VSV comparte con el virus de la gripe varias características: tiene un genoma en forma de hebra sencilla de polaridad negativa formando complejos de ribonucleoproteína,

activa el sensor de RNA RIG-I, es bloqueado por la proteína antiviral Mx y produce una rápida parada en la expresión génica del hospedador mediante el bloqueo de la actividad de la polimerasa celular y de la exportación nuclear de los mensajeros celulares (Ahmed & Lyles, 1998; Rieder & Conzelmann, 2009; Whelan et al., 2004). El otro virus utilizado fue adenovirus que al igual que el virus de la gripe depende fuertemente de factores celulares para su supervivencia y replicación dentro del núcleo celular, donde también induce importantes alteraciones en distintas subestructuras nucleares. En la **figura R11-A** se muestra por *Western blot* como los niveles de CHD6 no varían en infección a alta multiplicidad por VSV hasta las 8 h post-infección, cuando el efecto citopático propio de la infección por este virus comienza a ser evidente. En paralelo se observó la



**Figura R11. Análisis de la capacidad de degradación de CHD6 en infecciones por VSV y Adenovirus.** **(A)** Células A549 fueron pseudo-infectadas o infectadas con virus VSV a una MOI de 5 PFU/cel. A distintas horas post-infección, las células fueron recogidas y las cantidades de las proteínas celulares CHD6 y β-tubulina, y de las virales N, G y M de VSV, fueron analizadas por *Western blot*. **(B)** Células A549 fueron pseudo-infectadas o infectadas con Adenovirus serotipo 5 a una MOI de 7,5 PFU/cel. A 36 y 72 hpi se recogieron las células y se analizó la acumulación de proteína CHD6 y β-tubulina por *Western blot*. A la derecha se muestra una imagen captada a 36 hpi por microscopía de inmunofluorescencia contra proteínas de Adenovirus utilizando la mezcla de anticuerpos monoclonales MAB805 de Millipore (verde). La cantidad de células infectadas puede ser estimada en relación al número de células totales detectadas por DAPI (azul).



**Figura R12. Degradación de CHD6 en ratones infectados con el virus de la gripe.** Se utilizaron ratones sin infectar (Control), o inoculados intranasalmente con  $5 \times 10^5$  PFU/ratón de virus influenza recombinante que contiene los segmentos genómicos PA, PB1, PB2 y NP procedentes de la cepa VIC y el resto de segmentos procedentes de la cepa WSN. 6 ratones fueron utilizados para cada condición y su peso corporal fue evaluado diariamente. Cada 2 o 3 días, se sacrificaron dos ratones, se aislaron y homogenizaron los pulmones, y se determinó el título viral en los extractos pulmonares. **(A)** % del peso corporal de los ratones. **(B)** títulos virales en los extractos pulmonares. **(C)** Western blot contra las proteínas CHD6, CHD3 y DDX5 en el tejido pulmonar homogenizado. dpi: días post-infección.

acumulación de distintas proteínas virales como control de la correcta progresión de la infección. En **figura R11-B** se muestran los resultados para la infección a alta multiplicidad con adenovirus y como los niveles de CHD6 tampoco cambian cuando se consideran dos tiempos (36 y 72 h post-infección) en la cinética viral. En la Inmunofluorescencia adjunta se muestran la cantidad de células infectadas por adenovirus analizada en paralelo al ensayo descrito. Se aprecia que la infección era positiva en más del 90% de las células observadas por microscopio de fluorescencia.

Estos resultados indican que la degradación de CHD6, aunque parece ser un fenómeno habitual en el virus de la gripe, no ocurre en infecciones con otros dos tipos de virus que comparten ciertas similitudes con influenza.

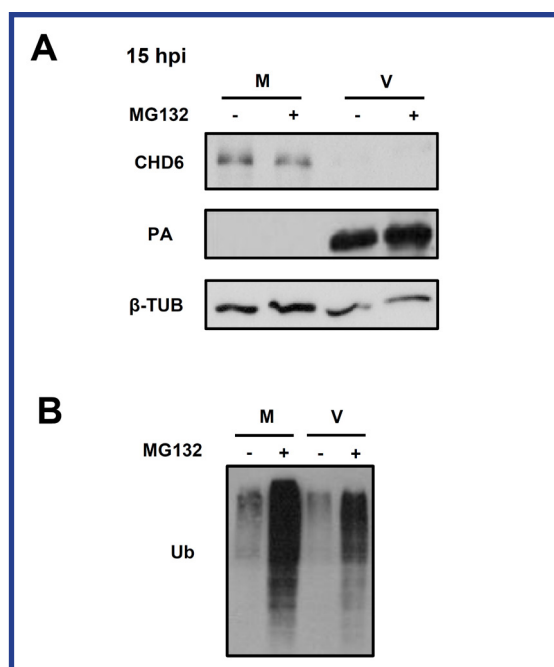
### 3.2.4 CHD6 es degradado en ratones infectados con virus de la gripe

La infección por el virus de la gripe en células de cultivo induce la degradación del remodelador de cromatina CHD6. Para conocer si ocurre lo mismo en animales, se realizaron ensayos de infección en ratones. Se pseudo-infectaron o infectaron intranasalmente ratones con virus recombinante que presenta los segmentos PA, PB1, PB2 y NP de VIC, y el resto (incluyendo HA y NA) del virus adaptado a crecer en ratón WSN. Se decidió utilizar este virus recombinante al ser más infectivo en ratones que la cepa viral VIC. Además, sabemos que degrada CHD6 en células de cultivo con igual

eficacia que virus VIC (datos no mostrados). Se utilizaron 6 ratones en total para cada condición y se sacrificaron dos, cada 2 o 3 días, en los que se midió el título viral en pulmón. El peso corporal en ratones pseudo-infectados no varió durante el experimento mientras que se registró una bajada aproximada del 20% en ratones infectados (gráfica en **Fig. R12-A**). Tanto la pérdida de peso corporal, como el mayor título viral recuperado en pulmón, fue obtenido a 7 días post-infección (gráficas en **Fig. R12-A y R12-B**). Se analizó igualmente el contenido de las proteínas CHD6, CHD3 y DDX5 en extractos de pulmón de los animales infectados por análisis de *Western blot* (**Fig. R12-C**). Los niveles de DDX5 no varían durante la infección por el virus de la gripe en células de cultivo y, por ello, se utilizó como control adicional (Jorba, 2009). En la **figura R12-C** se muestra como los niveles de CHD6 permanecen inalterados hasta los 5 días post-infección, y disminuyen drásticamente a los 7 días post-infección, concomitante con la mayor pérdida de peso registrada y el mayor título recuperado. En las mismas condiciones, las proteínas CHD3 y DDX5 no varían. Estos resultados indican que CHD6 es diana de degradación por el virus de la gripe también en modelo animal.

### 3.2.5 Mecanismo de degradación: es independiente del proteosoma y el complejo de la polimerasa viral es suficiente para inducir la degradación de CHD6

Para conocer el mecanismo de degradación de la proteína CHD6, analizamos inicialmente

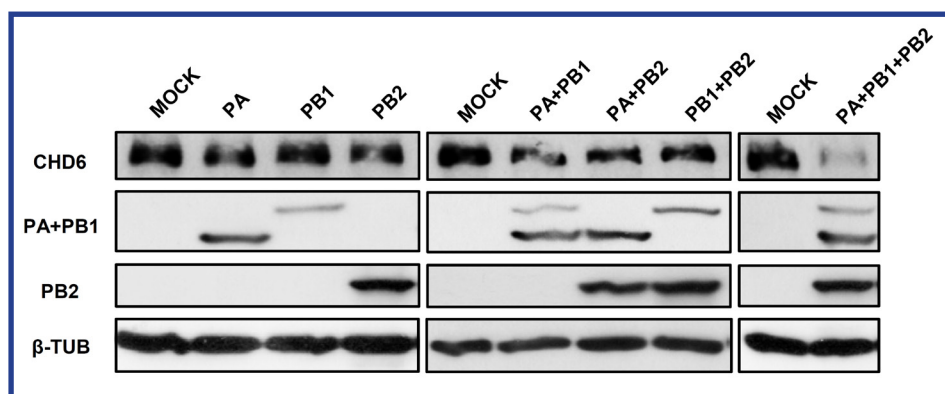


**Figura R13. Análisis de la implicación del proteosoma en la degradación de CHD6.** (A) Células A549, sin tratar (-) o tratadas (+) con el inhibidor del proteosoma MG-132 a una concentración de 25 nM, fueron pseudo-infectadas (M) o infectadas (V) con la cepa VIC a una MOI de 3 PFU/cel. A 15 hpi se recogieron las células y se analizó la cantidad de proteína CHD6 por *Western blot*. También fueron analizadas las acumulaciones de β-tubulina y PA como controles de carga y progresión viral, respectivamente. (B) Las mismas muestras que en (A), se analizó la cantidad de proteína ubiquitina como control del correcto funcionamiento de MG-132.

cual era la implicación del proteosoma celular en el proceso degradativo ya que este constituye la principal vía degradativa celular. La mayoría de las proteínas intracelulares que no son necesarias o están dañadas, son marcadas por ubiquitinación y, posteriormente, degradadas por el proteosoma en un proceso enzimático dependiente de ATP. Decidimos utilizar el inhibidor específico del proteosoma MG-132, que bloquea la maquinaria proteolítica y, consecuentemente, lleva a la acumulación en la célula de proteínas conjugadas con ubiquitina (Lee

& Goldberg, 1996). El tratamiento con el inhibidor, a una concentración de 25 nM, se inició en células A549 1 h antes de la pseudo-infección o infección con virus VIC a alta multiplicidad. A 15 h post-infección se observa degradación clara de CHD6 en células infectadas independientemente de si fueron o no tratadas con el inhibidor (**Fig. R13-A**). En la pseudo-infección no se aprecian diferencias en los niveles de CHD6 entre células tratadas y no. Como control del correcto funcionamiento del inhibidor, se muestra por *Western blot* la acumulación de proteínas ubiquitinadas en células tratadas (**Fig. R13-B**). Estos resultados indican que la degradación de CHD6 durante la infección es independiente del proteosoma.

Estudios previos han indicado que la expresión de la polimerasa del virus de la gripe fuera del contexto de la infección provoca la degradación de la subunidad mayor de la polimerasa II celular (Rodríguez et al., 2007; Vreede & Fodor, 2010). Teniendo en cuenta la interacción ya descrita entre CHD6 y la polimerasa viral, y conociendo la existencia de actividad proteolítica caracterizada en la subunidad PA del virus de la gripe (Sanz-Ezquerro et al., 1995; Zurcher et al., 1996), analizamos si, al igual que para la RNAP II, la sola expresión de las subunidades de la polimerasa (PA, PB1 y PB2) es suficiente para observar degradación de CHD6. Para ello se transfectaron células HEK293T con los plásmidos pCMV-PA, -PB1 y -PB2 y las células se recogieron a 20 h post-transfección para después ser analizadas por *Western blot*. Se expresaron las subunidades de la polimerasa individualmente, en combinaciones de dos, y las tres juntas formando la polimerasa heterotrimérica entera. En **figura R14** se observa una clara disminución en los niveles de CHD6 solo cuando se reconstituye la polimerasa entera. Se muestran también los niveles de proteína de las distintas subunidades de la polimerasa viral que confirman su correcta expresión en cada condición (**Fig. R14**). Estos datos muestran que la polimerasa fuera del contexto del virus, es capaz de inducir la proteólisis de CHD6 de forma análoga a la observada para la RNAP II.



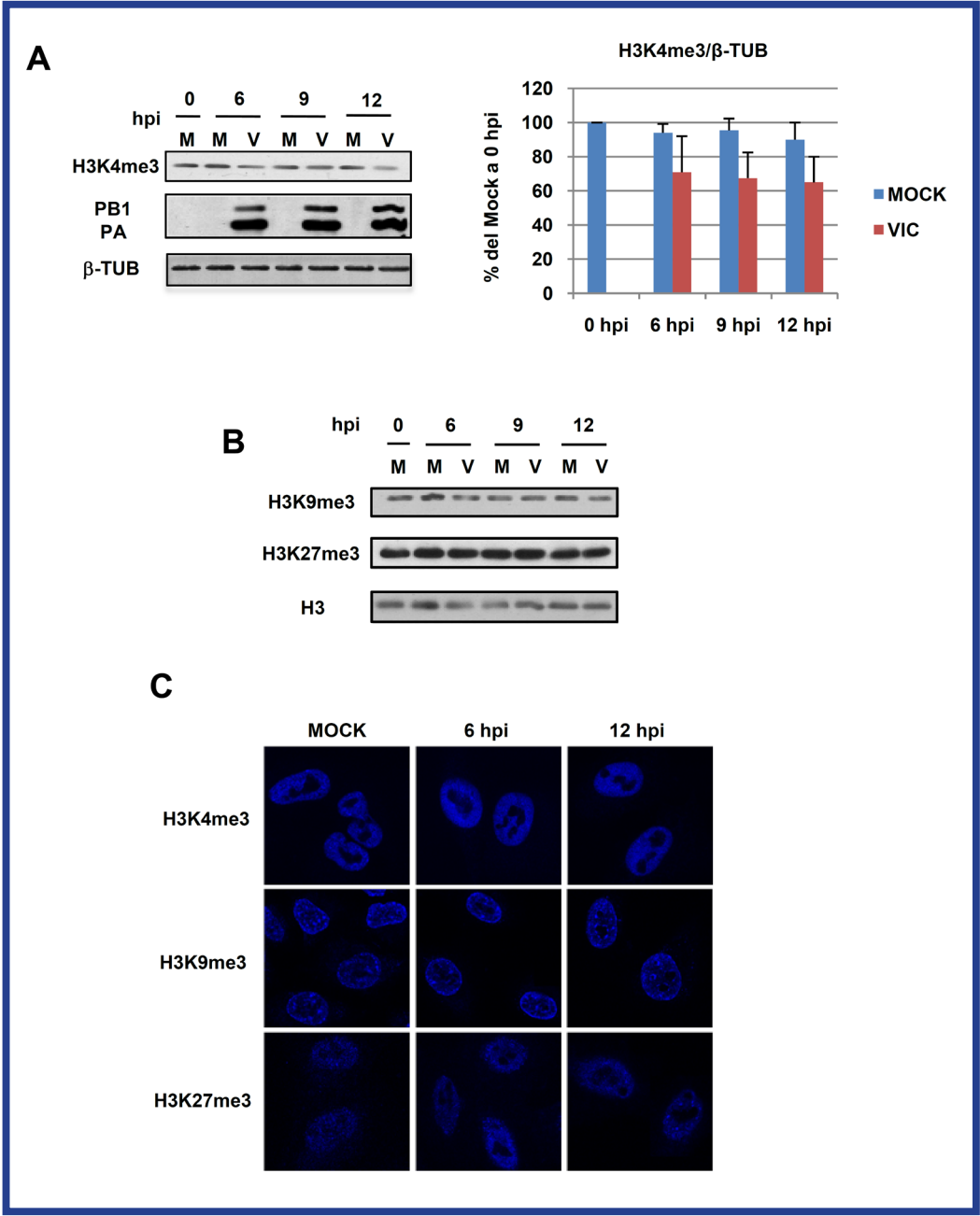
**Figura R14. Degradación de CHD6 en células con polimerasa viral reconstituida.** Células HEK293T fueron transfectadas con un plásmido vacío (MOCK) o con los plásmidos que expresan las subunidades PA, PB1 o PB2 de la polimerasa viral. Se transfectaron de forma individual, en combinaciones de dos, y las tres subunidades juntas, según se indica en la imagen. 24 horas post-transfección, la cantidad de CHD6 fue detectada por *Western blot*. También fueron analizadas las acumulaciones de  $\beta$ -tubulina y las distintas subunidades virales como controles de carga y expresión, respectivamente.

## 4. CHD6 SE RELOCALIZA A CROMATINA INACTIVA DURANTE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE

La modificación post-traducciona de las colas de las histonas de los nucleosomas es uno de los mecanismos que controlan la organización de la cromatina. El lenguaje complejo de estas modificaciones ha permitido sugerir la existencia de un “código de histonas” cuya correcta lectura podría permitir la división funcional de los distintos territorios de cromatina (Jenuwein & Allis, 2001). Es en la transcripción celular, y la posibilidad de dividir la cromatina en transcripcionalmente activa o inactiva, donde la acumulación diferencial de diversas modificaciones post-traduccionales ha sido ampliamente caracterizada. Generalmente, genes activos acumulados en regiones de eucromatina se correlacionan con la presencia de metilaciones en lisinas 4, 36 y 79 (H3K4, H3K36, y H3K79) de la cola de la histona 3, y genes silenciados enriquecidos en regiones de heterocromatina presentan metilaciones en lisinas 9, 27 de la cola de la histona 3, y lisina 20 de la cola de la histona 4 (H3K9, H3K27, y H4K20) (Berger, 2007; Li et al., 2007). En términos operativos, las modificaciones de histonas pueden funcionar como puntos de anclaje de diversos tipos de proteína o complejos de proteínas, dentro de los cuales cabe destacar los remodeladores de cromatina. Un importante dominio de unión a metilaciones de histonas es el cromodominio, perteneciente a la familia Royal de pliegues estructurales que unen lisinas metiladas. La familia CHD de remodeladores de cromatina

dependientes de ATP se caracteriza por presentar dos cromodominios en tándem. Estudios realizados con CHD1 humano muestran el requerimiento de los dos cromodominios para su unión a la lisina 4 tri-metilada en la histona 3 (H3K4me3). Las otras dos familias que contienen cromodominios son las proteínas asociadas a heterocromatina (HP1) y las proteínas CBX (homólogos de las proteínas Polycomb en *Drosophila*). HP1 y CBX reconocen lisinas metiladas en los residuos K9 y K27, respectivamente, que se correlaciona con genes transcripcionalmente silenciados.

Una parte importante de las RNPs del virus de la gripe está íntimamente unida a la matriz nuclear o a componentes de la cromatina (Bui et al., 2000; Bukrinskaya et al., 1979; Jackson et al., 1982; López-Turiso et al., 1990). Específicamente, se ha descrito la interacción entre proteínas del virus con nucleosomas (García-Robles et al., 2005; Zhirnov & Klenk, 1997). Mediante ensayos de interacción *in vitro* se demostró la interacción de las RNPs, NP libre y M1 con nucleosomas purificados. Además, a nivel funcional existen datos que sugieren que tanto la transcripción como la replicación viral ocurren en fracciones insensibles a DNasa, incluyendo cromatina y/o la matriz celular (Takizawa et al., 2006). A parte de esta interacción directa con cromatina, también se ha descrito la interacción entre componentes de las RNPs y proteínas



**Figura R15. Análisis de la acumulación y del patrón de distribución intranuclear de los marcadores de cromatina activa e inactiva durante la infección viral. (A)** Células A549 fueron pseudo-infectadas (M) o infectadas con virus VIC (V) a una MOI de 3 PFU/cel. A los tiempos post-infección indicados, se recogieron las células y los extractos celulares fueron analizados por Western blot para la detección de la proteína H3K4me3. Las proteínas  $\beta$ -tubulina y PA/PB1 virales fueron detectadas en paralelo como controles de carga y progresión viral, respectivamente. Adjunto se muestra una representación gráfica de la media de relaciones H3K4me3/ $\beta$ -tubulina de tres experimentos independientes. **(B)** Similar a (A) pero detectando las proteínas H3K9me3, H3K27me3 e histona 3 total. **(C)** Células A549 crecidas sobre cubreobjetos fueron infectadas como en el apartado (A), recogidas a los tiempos indicados y procesadas para llevar a cabo microscopía de Inmunofluorescencia confocal usando anticuerpos contra las modificaciones H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3

celulares asociadas a cromatina (incluyendo CHD6).

En este apartado se pretende analizar la relación entre CHD6 y las RNPs virales desde el

punto de vista de la cromatina celular. Para ello caracterizamos las posibles interrelaciones entre ambas maquinarias teniendo en cuenta su común capacidad para unir cromatina.



#### 4.1 Análisis de la metilación de lisinas en la cola de la histona 3

Teniendo en cuenta que los complejos de las RNPs virales son capaces de unir histonas (incluyendo las colas de histonas) y el fuerte bloqueo en la transcripción celular inducida por la infección con el virus de la gripe, se analizaron posibles cambios en marcadores epigenéticos altamente representados en genes transcripcionalmente activos o inactivos. Se seleccionaron para éste y posteriores análisis, los siguientes metilaciones en la cola de la histona 3: 1) tri-metilación en la lisina 4 en la cola de la histona 3 (H3K4me3) como representante de modificación de eucromatina (rica en genes activos); 2) tri-metilación en la lisina 9 y la lisina 27 en la cola de la histona 3 (H3K9me3 y H3K27me3) como representantes de modificaciones de heterocromatina (rica en genes inactivos).

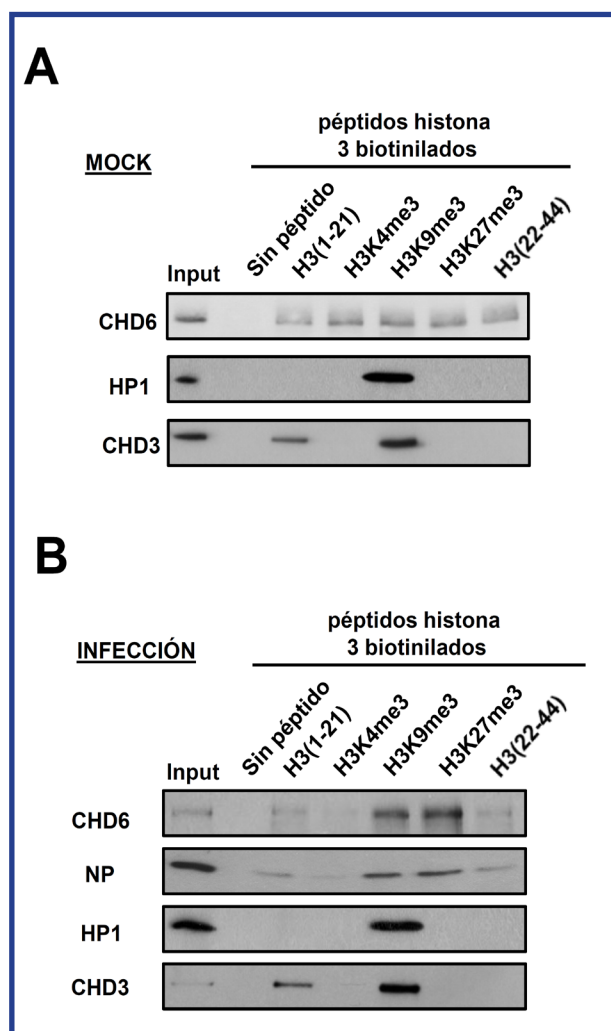
Inicialmente se determinó si existían diferencias en las cantidades de estas modificaciones durante la infección por el virus de la gripe. Para ello, se pseudo-infectaron o infectaron células A549 a alta multiplicidad y se analizó por *Western blot* los niveles de cada tipo de metilación y de histona 3 total, a distintas horas post-infección. Como se puede observar en la **figura R15-A**, los niveles de H3K4me3 (representados en la gráfica como relación H3K4me3/  $\beta$ -tubulina de tres experimentos independientes) parecen disminuir ligeramente hasta alcanzar una cantidad aproximada de 35% con respecto a los niveles observados en la pseudo-infección. Esta bajada no se observó para los marcadores de heterocromatina, H3K9me3 y H3K27me3, ni tampoco para H3 total (**Fig. R15-B**). El hecho de que bajen los niveles de H3K4me3, sin observarse bajada de histona 3 total, invalida la posibilidad de que la disminución sea debido a corte o degradación del extremo amino terminal de la histona.

También se abordó la posibilidad de que la infección por el virus de la gripe varíe la distribución intranuclear de estos marcadores. Como se puede observar en la **figura R15-C** la distribución de cada marcador dentro del núcleo en células pseudo-infectadas es similar al descrito previamente (Zinner et al., 2006). H3K4me3 presenta una distribución por todo el nucleoplasma acorde con su fuerte colocalización con mRNA celular naciente, y H3K9me3/H3K27me3 se encuentran acumulados principalmente en la periferia del núcleo y alrededor del nucleolo. Cuando se compara ésta distribución con la obtenida en células infectadas, no se aprecian cambios evidentes. La detección de NP viral fue analizada en paralelo para comprobar el estado de la infección (datos no mostrados).

#### 4.2 CHD6 se asocia con las colas de la histona 3 metiladas y su patrón de unión cambia en infección por el virus de la gripe

Ensayos de unión a péptidos sintéticos y análisis de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) han demostrado la asociación de CHD8 y CHD7, miembros pertenecientes a la subfamilia III de CHD, a marcas epigenéticas definidas por metilaciones en la lisina 4 de la histona 3 (Rodríguez-Paredes et al., 2009; Schnetz et al., 2009). Por otra parte, análisis filogenéticos basados en alineamientos de secuencias de todos los cromodominios en el genoma humano destacan la proximidad de secuencia entre los tandems de cromodominios de los miembros CHD de la subfamilia III (Flanagan et al., 2007; Yap & Zhou, 2011). Puesto que CHD6, remodelador de cromatina implicado en la transcripción celular (Lutz et al., 2006; Nioi et al., 2005), interacciona con las RNPs virales y, además, cambia su distribución intranuclear durante la infección por el virus de la gripe, analizamos si ésta proteína se asocia con residuos específicos metilados en histona 3 y si la asociación variaba durante la infección. Para abordar estos estudios se realizaron aproximaciones experimentales en condiciones *in vitro* e *in vivo* que se detallan a continuación.

Se realizó un primer abordaje *in vitro* a través de ensayos de *pull-down* de unión a péptidos sintéticos de histona 3. Los péptidos utilizados corresponden a las colas amino terminales de la histona 3 (1-21) o (22-44) que no contienen o contienen un único motivo de tri-metilación en la lisina 4, 9 o 27, y conjugados con biotina. Estos péptidos se unieron a resinas de avidina monomérica-agarosa y se usaron en ensayos de *pull-down* con extractos nucleares de células HEK293T pseudo-infectadas o infectadas con virus VIC (ver **Fig. M2**). Se usaron células infectadas a alta multiplicidad y recogidas a 6 h post-infección, ya que es un tiempo intermedio del ciclo viral donde el proceso de degradación de CHD6 acaba de empezar (**Fig. R8**) y, además, se observa un claro cambio en la distribución intranuclear de la proteína (**Fig. R6**). Después de lavados extensivos, se analizó por *Western blot* la presencia de las proteínas CHD6, CHD3 y HP1 $\alpha$ , estos dos últimos usados como controles. No se observa una clara preferencia en la unión de CHD6 por los péptidos metilados cuando se utilizan extractos nucleares de células pseudo-infectadas (**Fig. R16-A**). No obstante, en extractos de células infectadas se aprecia una mayor asociación del remodelador de cromatina con marcadores de heterocromatina H3K9me3 y H3K27me3 (**Fig. R16-B**). Tanto los controles CHD3, como HP1 $\alpha$ , no varían sus preferencias de unión cuando se utilizan



**Figura R16. Análisis de la asociación *in vitro* de NP y CHD6 con péptidos sintéticos de la cola de histona 3.** (A) Extractos nucleares de células HEK293T fueron pre-clareados con resina de avidina monomérica-agarosa. El material no pegado fue incubado con resinas a las que se acoplaron los siguientes péptidos sintéticos biotinilados: amino ácidos 1-21 de la cola de la histona 3 no metilado (H3(1-21)), o metilada en lisina 4 (H3K4me3) o lisina 9 (H3K9me3); aminoácidos 21-44 de la cola de la histona 3 no metilado (H3(22-44)), o metilado en lisina 27 (H3K27me3). Las resinas fueron lavadas extensamente y el material asociado a las mismas fue analizado por *Western blot* contra las proteínas CHD6, CHD3 y HP1 $\alpha$ . (B) Similar a (A), pero utilizando extractos nucleares de células HEK293T infectadas con la cepa VIC y recogidas a 6 hpi.

ambos tipos de extractos nucleares. Además, la asociación de ambas proteínas está conforme con lo ya descrito anteriormente (Bannister et al., 2001; Nishioka et al., 2002; Zegerman et al., 2002). Cabe destacar que CHD6 forma parte de complejos multiproteicos de alto peso molecular (Lutz et al., 2006) y, por lo tanto, en este ensayo no podemos descartar que la asociación inducida en la infección sea indirectamente mediada por otras proteínas celulares o virales. También se analizó la

presencia de la proteína viral NP teniendo en cuenta las siguientes premisas: 1) NP es el componente mayoritario de los complejos ribonucleoproteínas (RNPs) virales que colocaliza con CHD6 durante la infección, y 2) estudios previos han demostrado la capacidad de interacción de NP con colas de histonas (García-Robles et al., 2005). Notablemente, se observó una importante retención de NP junto a CHD6 en las resinas representando los marcadores de cromatina inactiva (Fig. R16-B).

Para confirmar estos resultados, realizamos estudios adicionales *in vivo*. Se llevaron a cabo análisis de colocalización por Inmunofluorescencia confocal en los que se examinaron cambios en la asociación de CHD6 con las marcas epigenéticas H3K4me3, -K9me3 y -K27me3, utilizados en apartados anteriores. Los análisis por Inmunofluorescencia confocal se llevaron a cabo utilizando secciones confocales individuales y máscaras de colocalización en los que se obtuvieron imágenes binarias mostrando solo píxeles solapantes (ver Materiales y Métodos). En células A549 no infectadas, CHD6 colocaliza principalmente con H3K4me3, aunque también se observó cierta asociación con H3K9me3 y H3K27me3 (Fig. R17, paneles MOCK, CHD6-H3Kme3). Este resultado confirma resultados previos que muestran la asociación de CHD6 con sitios de síntesis de mensajeros celulares en el núcleo celular (Lutz et al., 2006). El mismo análisis en células infectadas muestra no solo el cambio en la distribución intranuclear de CHD6 ya descrita, sino que también observamos un importante incremento en la colocalización CHD6-H3K9me3 (de 24% en pseudo-infección a 66% en infección) (Fig. R17, paneles 9hpi, CHD6-H3Kme3 y diagrama adjunto). Además, se aprecia un ligero aumento en la colocalización CHD6-H3K27me3 (de 45% a 55%), sin que se observen variaciones significativas en la colocalización CHD6-H3K4me3.

Los estudios *in vivo* e *in vitro* realizados muestran conjuntamente que durante la infección por el virus de la gripe se induce la asociación de CHD6 a marcadores característicos de cromatina transcripcionalmente inactiva.

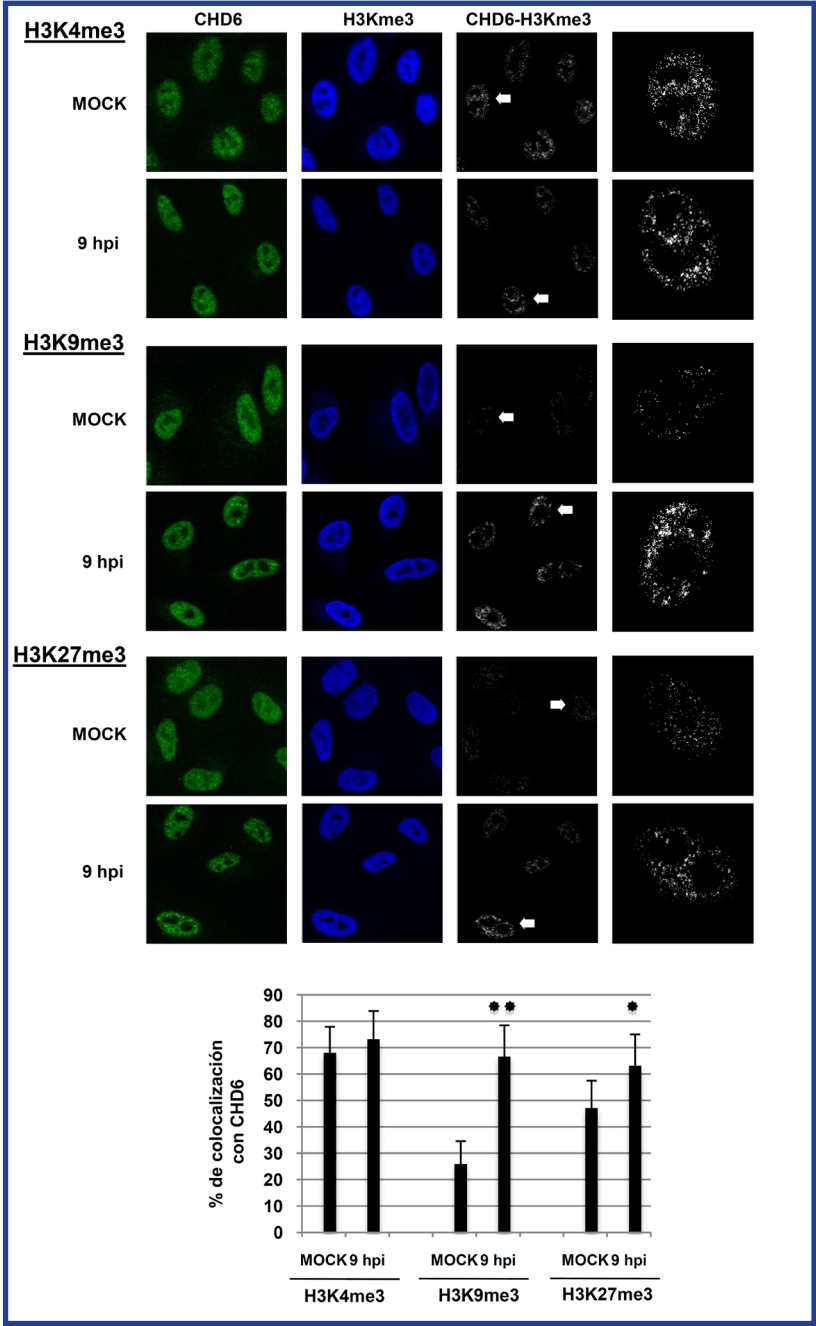
#### **4.3 Las ribonucleoproteínas virales (RNPs) y CHD6 colocalizan con el marcador de heterocromatina H3K9 tri-metilado**

Estudios previos han destacado la distribución asimétrica asumida por la nucleoproteína (NP) viral momentos antes de la exportación de las RNPs al citoplasma (Elton

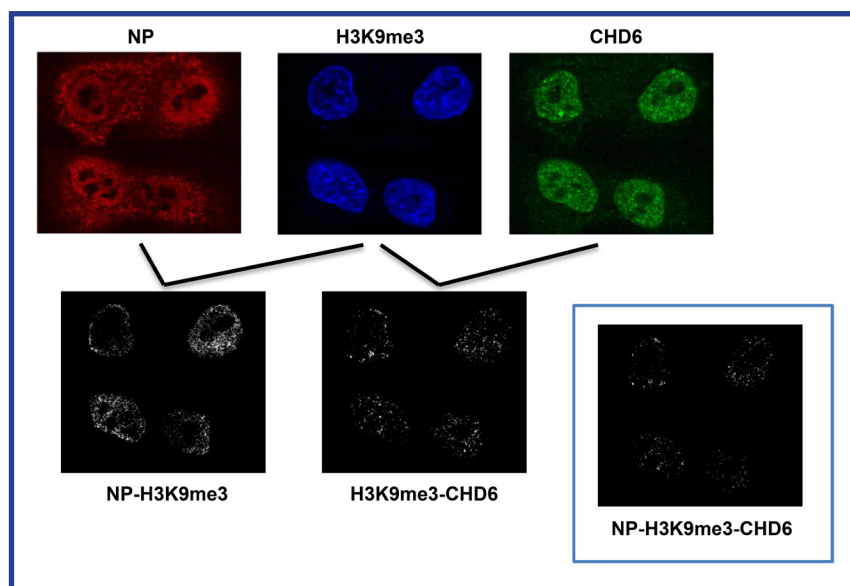


et al., 2005a). Este posicionamiento genómico viral en la periferia de la célula infectada queda acentuada en células tratadas con leptomicina B en las que la exportación de las RNPs virales está bloqueada (Ma et al., 2001). Además, cuando se eliminan las RNPs solubles en células infectadas tratadas con detergentes, se observa claramente que las RNPs restantes presentan una localización periférica dentro del núcleo (Ma et al., 2001). Puesto que la distribución intranuclear de H3K9me3 es especialmente abundante en la periferia del núcleo (Payne & Braun, 2006; Zinner et al., 2006), y la asociación de CHD6 con este marcador se incrementa significativamente a tiempos tardíos de infección (Fig. R16-B y R17) junto a la nucleoproteína

NP viral en ensayos *in vitro* (Fig. R16-B), analizamos si las RNPs virales dentro del núcleo de la célula infectada están asociados con H3K9me3 junto a CHD6 *in vivo*. Para ello realizamos ensayos de colocalización mediante microscopía confocal. En células A549 infectadas con VIC se observa que, a 9 h post-infección, tanto NP como CHD6 se asocian con H3K9me3 (Fig. R18, paneles NP-H3K9me3 y H3K9me3-CHD6, respectivamente). Después, se obtuvieron imágenes de triple colocalización destacando únicamente las señales solapantes en las que se aprecia, y de forma concordante a lo ya visto *in vitro*, un cierto número de puntos de asociación CHD6-H3K9me3 que también contiene la proteína NP. Estos resultados sugieren,



**Figura R17. Cambios en la asociación de CHD6 con lisinas metiladas de la cola de la histona 3 durante la infección viral.** Células A549 fueron pseudo-infectadas (MOCK) o infectadas con virus VIC a una MOI de 3 PFU/cel. A 9 hpi las células fueron fijadas y procesadas para la realización de ensayos de microscopía de Inmunofluorescencia confocal utilizando anticuerpo contra CHD6 junto a otro de los siguientes anticuerpos: anti-H3K4me3, anti-H3K9me3 o anti-H3K27me3. Los paneles CHD6-H3Kme3 muestran las señales de colocalización común para la pareja de anticuerpos correspondiente, y el panel adyacente presenta la imagen ampliada de la célula indicada con flecha. El experimento se realizó tres veces y se muestran imágenes representativas. La representación gráfica adjunta muestra la cuantificación del nivel de colocalización de células individuales provenientes de tres secciones distintas de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican significación estadística determinada por la distribución de la T de student (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.0001$ ).



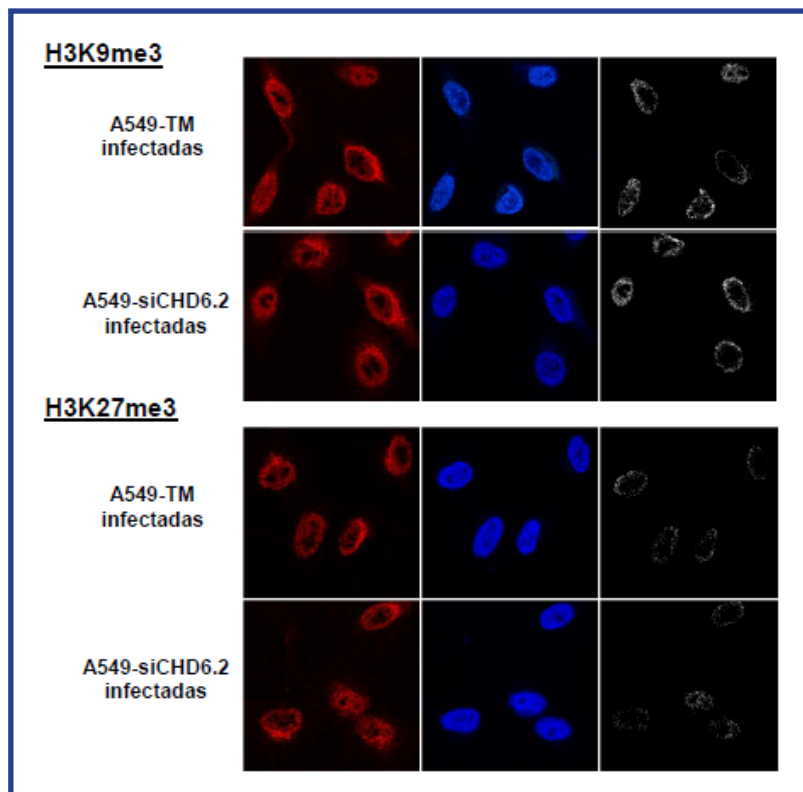
**Figura R18. Colocalización de CHD6 con NP y H3K9me3 en células infectadas por el virus de la gripe.** Se infectaron células A549, crecidas sobre cubreobjetos, a una MOI de 3 PFU/cel. A 9 hpi, las células fueron fijadas y procesadas para llevar a cabo análisis por microscopía de Inmunofluorescencia confocal, utilizando anticuerpos contra las proteínas NP (rojo), H3K9me3 (azul) y CHD6 (verde). Los paneles de colocalización NP-H3K9me3 y H3K9me3-CHD6 muestran la señal común para la pareja de anticuerpos correspondiente. El panel NP-H3K9me3-CHD6 muestra la señal solapante cuando se tienen en consideración los tres anticuerpos. El experimento se repitió tres veces y se muestran imágenes representativas.

sin descartar la participación de otras proteínas celulares y/o virales, que las RNPs virales podrían estar implicadas en el reclutamiento de CHD6 a sitios de cromatina inactiva.

#### 4.4 CHD6 no media la asociación de NP con cromatina inactiva

Los datos obtenidos hasta ahora indican una acumulación de las RNPs virales y CHD6 en marcadores de cromatina inactiva durante la

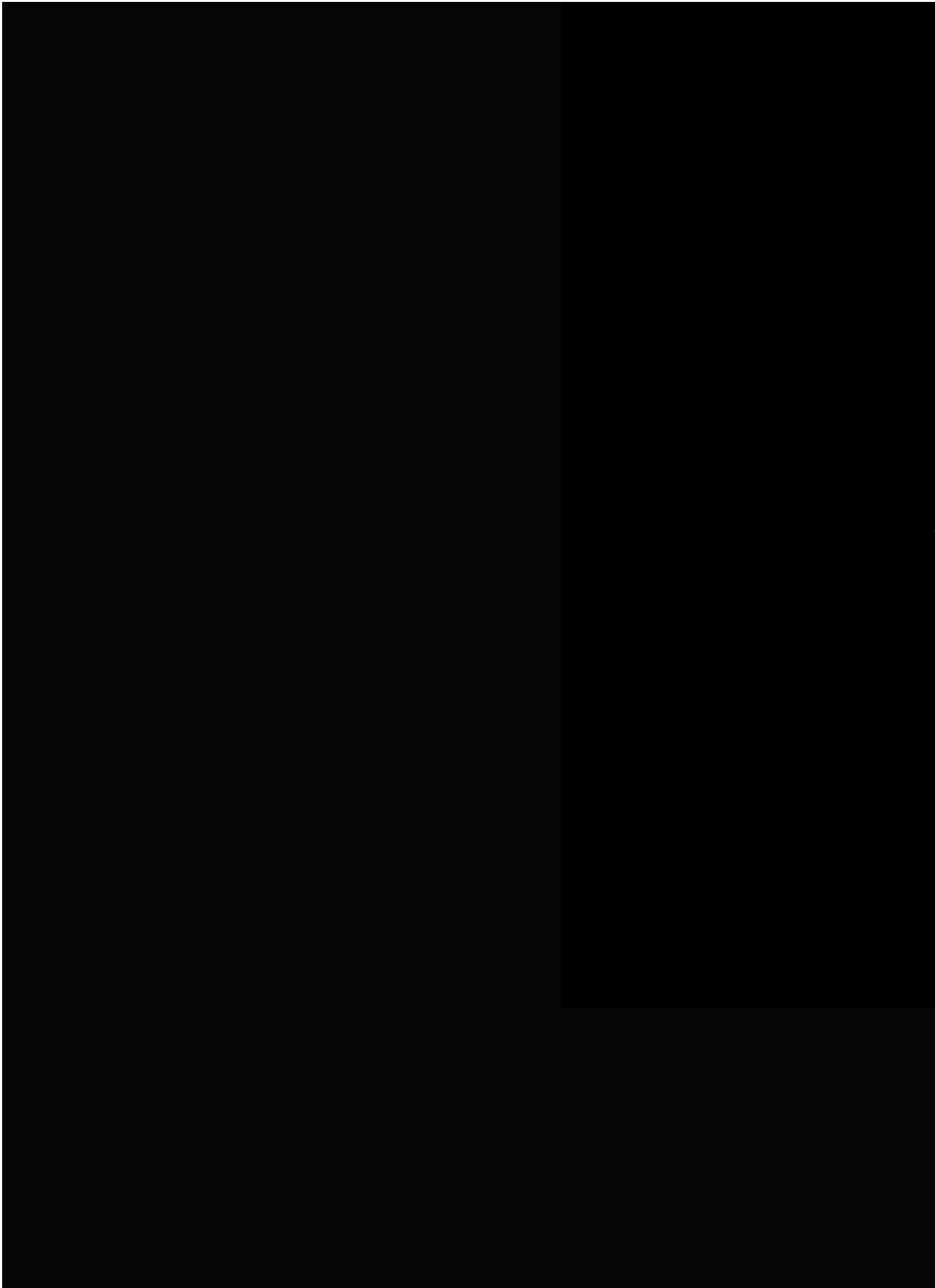
infección por el virus de la gripe. Dada la capacidad de ambas por unir cromatina, y dada la ya descrita asociación entre CHD6 y las RNPs virales durante la infección, analizamos la implicación del remodelador de cromatina CHD6 en la asociación de las RNPs con H3K9me3. Para ello se realizaron experimentos de colocalización como los ya descritos, pero esta vez en infecciones de células A549 control (A549-TM) o establemente silenciadas para CHD6 (A549-siCHD6.2). Previo a este ensayo, se confirmó por Inmunofluorescencia que ninguna de las líneas celulares presenta alteraciones en los marcadores estudiados (datos no mostrados). Como se puede

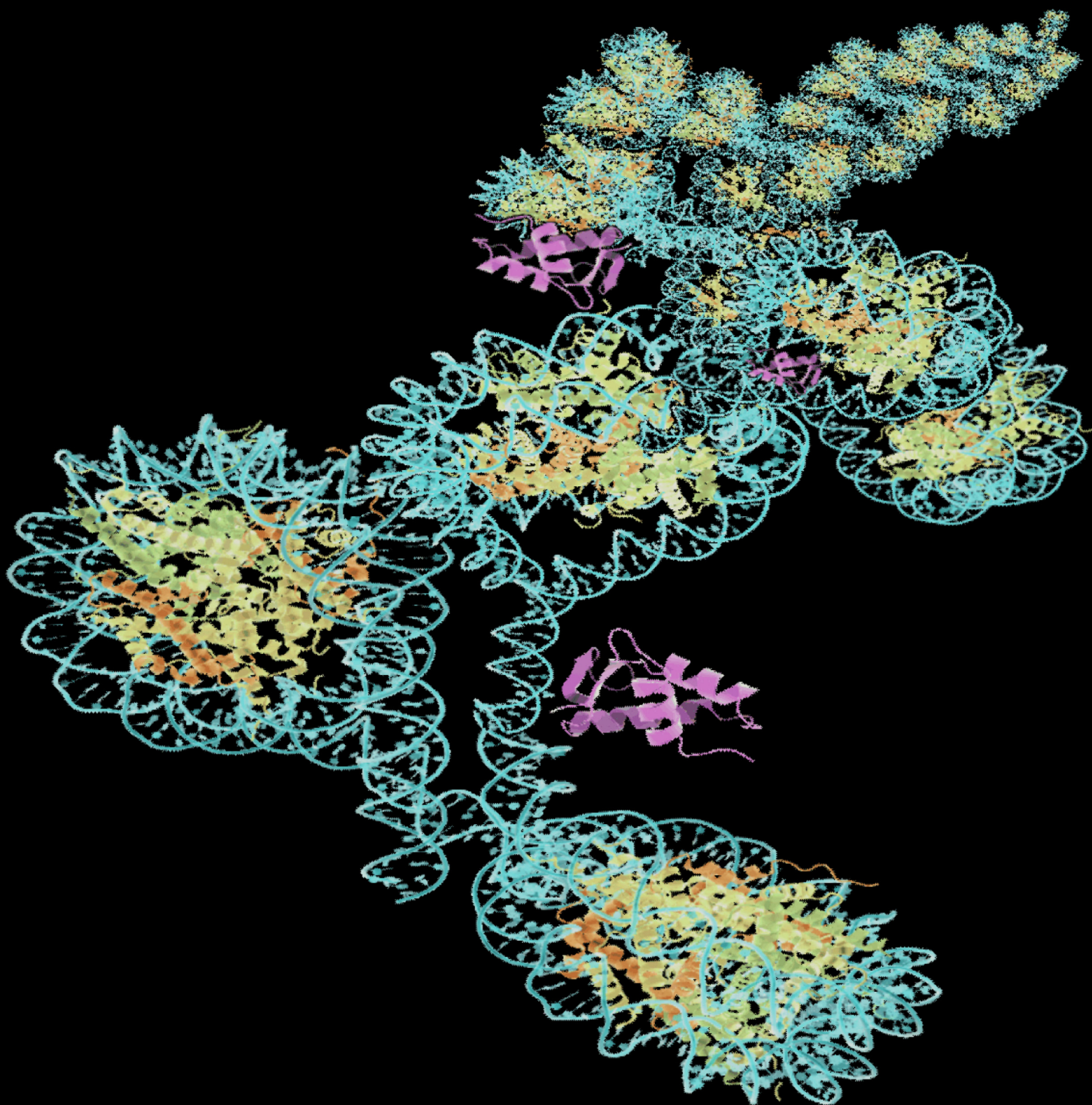


**Figura R19. Análisis de la implicación de CHD6 en la asociación de vRNPs con lisinas metiladas de la cola de la histona 3 durante la infección viral.** Células A549 control (-TM), o silenciadas para CHD6 (-siCHD6.2) fueron infectadas con virus VIC a una moi de 3 PFU/cel. A 9 hpi las células se fijaron y se procesaron para ensayos de microscopía confocal de Inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo contra NP junto a otro anti-H3K9me3, o anti-H3K27me3. Los paneles de colocalización NP-H3Kme3 recogen las señales comunes para la pareja de anticuerpos correspondiente. El experimento se realizó tres veces y se muestran imágenes representativas.

observar en la **figura R19**, la asociación de las RNPs con los distintos marcadores de cromatina no parece variar en ambas células indicando que CHD6 no es el mediador de esta asociación y

sugiriendo que son las propias RNPs virales las que podrían estar implicadas en inducir el reclutamiento de CHD6 a cromatina inactiva durante la infección por el virus de la gripe.





# DISCUSIÓN





Los genes celulares se expresan como resultado de un proceso minuciosamente coreografiado de transcripción, procesamiento de pre-mRNA, exportación de ribonucleoproteínas y traducción. Adicionalmente, y como ya hemos visto en la introducción, el estado de transcripción de un gen se encuentra íntimamente ligado a la estructura de la cromatina donde se encuentra. Durante la activación transcripcional, diversos mecanismos permiten la descondensación de la cromatina que lleva a la apertura de la estructura y facilita la interacción entre el DNA y la maquinaria general de transcripción. Estas modificaciones se encuentran bajo el control de mecanismos epigenéticos que “etiquetan” un gen específico con un estado de cromatina concreto. Por lo tanto, la modulación de la configuración de la cromatina representa un mecanismo poderoso de regulación transcripcional, que puede ser empleado por patógenos para imponer su propia firma transcripcional. Sin embargo, la modificación de la cromatina constituye también un reto formidable para el patógeno ya que debe contrarrestar las fuerzas que llevan a la formación de cromatina.

Han pasado 30 años desde que se sabe que el virus de la gripe transcribe y replica en el núcleo celular, asociado a la cromatina nuclear y en un proceso dependiente de la RNA polimerasa II celular (Bouloy et al., 1978; Herz et al., 1981; Jackson et al., 1982; Krug et al., 1979). Sin embargo, todavía se desconoce prácticamente por completo la importancia que la estructura de la cromatina puede tener en la replicación del virus de la gripe y si ésta sufre alteraciones durante la infección. El espectacular avance en los últimos 15 años sobre la regulación y dinámica de la cromatina celular, y su importancia en procesos biológicos fundamentales para la célula, permite nuevos abordajes experimentales para el estudio de la interrelación entre la cromatina y el virus de la gripe.

## 1. Identificación de la proteína CHD6 como nuevo factor asociado a las RNPs virales que actúa como modulador negativo de la replicación del virus de la gripe

### 1.1 El virus de la gripe se relaciona con CHD6 y otras proteínas asociadas a cromatina

El virus de la gripe es un virus RNA excepcional al replicar y transcribir su genoma en el núcleo de la célula infectada. Las complejas reacciones implicadas en estos procesos son llevadas a cabo exclusivamente por las RNPs virales. Es por ello por lo que se ha sugerido la implicación de numerosos factores nucleares asociados a estas RNPs, y el secuestro de numerosa maquinaria nuclear, durante el proceso de replicación viral. Con la intención de buscar nuevos factores asociados a la polimerasa viral y en concreto a la subunidad PA de la polimerasa, se realizaron en nuestro laboratorio ensayos de interacción de doble híbrido en levadura. Entre las proteínas que cumplieron los requisitos de interacción, se encuentra el remodelador de cromatina CHD6 dependiente de ATP. A nivel celular, nuestro laboratorio determinó la asociación entre éste factor y regiones nucleares implicadas en la transcripción mediada por la RNAP II (Lutz T., et al., 2006). Teniendo en cuenta su relación con transcripción celular, y el hecho de que pertenezca a una familia de proteínas que se han visto asociadas a cromatina, nos pareció interesante ahondar sobre la posible relación entre el virus de la gripe y CHD6. En primera instancia, mostramos la asociación de CHD6 con las RNPs virales dentro del núcleo infectado. Utilizando ensayos *in vitro*, mostramos la asociación entre CHD6 y las tres subunidades de la polimerasa viral durante la infección, y con PB2 individualmente (**Fig. R1**). Aunque no se pudo observar coinmunoprecipitación de NP, ensayos de colocalización por microscopía de Inmunofluorescencia confocal en células infectadas revelan un alto grado de asociación entre NP nuclear, que se encuentra mayoritariamente formando RNPs, y CHD6 (**Fig. R2**). Luego, probablemente CHD6 se encuentre asociado con RNPs virales durante la infección por el virus de la gripe.

En el último año se han realizado varios ensayos de interacción y silenciamiento por RNA interferente a gran escala que han proporcionado una amplia lista de factores asociados con proteínas virales y/o relevantes para la replicación del virus de la gripe. Entre los factores importantes para la correcta replicación del virus de la gripe, existen varios que han sido relacionados con la cromatina celular, o que presentan dominios que sugieren esa relación. Uno de ellos es TRIM 28 (también llamado KAP1), perteneciente a la familia de proteínas TRIM. TRIM28 presenta en el extremo amino-terminal un RING *finger*, 2 cajas-B y varios dominios *coiled-coil* (colectivamente llamados dominio RBCC), y en el carboxilo-terminal tiene dominios Bromo y PHD que



le permiten su unión a cromatina. Funcionalmente, ha sido relacionada con procesos de represión transcripcional, mediados por el reclutamiento del complejo deacetilasa NuRD y la metiltransferasa de histona SETDB1. También media la metilación de la histona 3 en H3K9, y el posicionamiento de HP1 en regiones promotoras de genes diana. No obstante, también se ha descrito su relación con activación transcripcional. En dos de los ensayos de silenciamiento multigénico descritos, se muestra el requerimiento de TRIM28 para la correcta replicación del virus de la gripe (Brass et al., 2009; König et al., 2010), es más, TRIM28, de forma paralela a CHD6, también interacciona con las vRNPs (König et al., 2010). Curiosamente, TRIM28 ha sido descrito, al igual que CHD6, como co-factor en el proceso de represión de los genes E6/E7 del virus del papiloma humano mediado por la proteína E8<sup>A</sup>E2C (Ammermann et al., 2008; Fertey et al., 2010). Fuera del contexto de virus, CHD6 y TRIM28 también coinciden como co-factores de los factores de transcripción NRF2 (Maruyama et al., 2011; Nioi et al., 2005), implicado en la respuesta a stress oxidativo, y AIRE (Abramson et al., 2010), regulador autoinmune. Estas similitudes podrían ser indicativas de la co-existencia de ambas proteínas en el complejo o complejos implicados en la regulación de la expresión transcripcional de determinados genes celulares y virales. Otras proteínas relacionadas con cromatina e implicadas con la replicación del virus de la gripe, son: MCM2, SUPT6H, PHF2, MLL2, DDB1, PARP-1, e histona 3. La asociación de proteínas virales con componentes primarios de la cromatina y factores asociados a cromatina, incluyendo CHD6, podría sugerir una relevancia funcional de ésta estructura durante la replicación del virus de la gripe.

## 1.2 ¿Es CHD6 un modulador de la actividad antiviral?

Con el objetivo de determinar el efecto que CHD6 induce en la infección viral, se realizaron ensayos de infección en células A549 en las que se silenció la proteína CHD6 (**Fig. R5**). En infecciones a baja multiplicidad ( $10^{-3}$  PFU/ml), se observa un incremento, de entre 5 y 10 veces, en la producción de virus que se obtiene a partir de células CHD6 silenciadas con respecto a las células control. La obtención de mayor cantidad de virus se correlaciona, inversamente, con el grado de silenciamiento de la línea celular infectada, apoyando la noción de que el efecto es específico del silenciamiento de CHD6. No vimos, sin embargo, diferencias en la producción de virus en ensayos de infección a alta multiplicidad (3 PFU/ml) (datos no mostrados), lo cual sugiere

la necesidad de que se produzcan varios ciclos infectivos en células sin CHD6 para poder observar el efecto.

La lista de factores celulares asociados a proteínas del virus de la gripe, incrementada considerablemente tras los últimos experimentos de amplio espectro ya descritos, muestran una mayoría aplastante de proteínas que actúan como moduladores positivos de la replicación viral. El número de moduladores negativos asociados a proteínas virales es muy inferior. Los moduladores negativos de gripe mejor descritos son las proteínas implicadas en la respuesta antiviral innata. No descartamos la implicación de CHD6 en éste tipo de respuestas, y sería muy atractivo conocer si CHD6 actúa como factor de transcripción en la expresión inducida de genes del sistema interferón. En este sentido, es interesante anotar la reciente implicación de varios remodeladores de cromatina como reguladores de la apertura y el acceso al DNA de genes del interferón (Cui et al., 2004). Experimentos de medida de actividad en genes reporteros bajo promotores de genes inducibles por interferón (como el promotor del gen IFN  $\beta$ ), y estudios de crecimiento de virus defectivos en el bloqueo de la respuesta interferón en células CHD6 silenciadas, son ejemplos de experimentos que permitirían ahondar sobre ésta posibilidad. En contra de ésta hipótesis, estudios recientes dirigidos a conocer genes regulados por CHD6 no muestran genes implicados en el sistema de interferon o respuesta antiviral (P. Chavez, datos no publicados). No obstante, sería preciso conocer si CHD6 regula genes implicados en esta respuesta durante la infección.

## 1.3 Posible implicación de otros miembros CHD en la infección por el virus de la gripe

Los remodeladores de cromatina de la subfamilia III de CHDs presentan similitudes estructurales que podrían indicar cierto solapamiento funcional entre los miembros. Se ha descrito la asociación entre CHD7 y CHD8, tanto *in vitro* como *in vivo*, y las implicaciones que ésta asociación podría tener en la patología del síndrome de CHARGE (Batsukh et al., 2010). A nivel de virus, es de destacar datos preliminares que indican la asociación de proteínas de la polimerasa del virus de la gripe con el miembro de la subfamilia III CHD8 (datos no mostrados). Estos resultados sugieren una relación más compleja entre el virus y proteínas remodeladores de cromatina ATP-dependientes. Es más, CHD8 y CHD6 podrían desarrollar una actividad redundante durante la infección por

el virus de la gripe. Estudios adicionales para conocer la implicación de CHD8 en la infección viral, y la relación que ésta implicación tendría con la ya observada para CHD6, son necesarios para esclarecer el efecto que este tipo de proteínas ejerce sobre la replicación del virus de la gripe.

#### 1.4 Posibles mecanismos de inhibición viral llevados a cabo por CHD6

Los ensayos de mayor actividad enzimática desarrolladas por las RNPs virales en células CHD6 silenciadas (**Fig. R4**), sugieren una mayor actividad de replicación o transcripción virales en ausencia de CHD6. Estos ensayos no permiten discernir entre ambos procesos, y experimentos adicionales en los que se puedan considerar la acumulación de las distintas formas de RNAs virales (por ejemplo, en ensayos de *primer-extension* o RT-PCR cuantitativa), serían necesarios. Los resultados en los ensayos de actividad enzimática en reconstituciones de RNPs, tampoco descartan la posibilidad de que otros procesos virales estén siendo afectados por la ausencia de CHD6. Al ser un factor celular exclusivamente nuclear (Lutz et al., 2006), se descarta la implicación de CHD6 en la traducción viral. No obstante, procesos como la formación de las distintas formas de RNPs virales dentro del núcleo, el tráfico intranuclear de las 4 proteínas virales que constituyen las RNPs, la liberación de mRNPs de la cromatina y su posterior salida del núcleo, sí podrían estar afectados por la ausencia de éste remodelador de cromatina. Teniendo en cuenta su vinculación con la transcripción celular, y su unión con la polimerasa del virus de la gripe (**Fig. R1**), una posible vía de interferencia desarrollada por CHD6 sería su actuación como competidor transcripcional.

Otros factores celulares que interaccionan con proteínas virales y actúan como moduladores negativos de la infección por el virus de la gripe, son: Hsp70 (*Heat Shock Factor* 70), NF90 (*Nuclear Factor* 90) y RBL2 (*RuvB-Like protein* 2). Diversos estudios muestran como éstos factores asociados unen y secuestran subunidades de la polimerasa viral y NP (Hirayama et al., 2004; Kakugawa et al., 2009; Wang et al., 2009). En el caso concreto de Hsp70, recientemente se describió su interacción con las subunidades PA y PB1 de la polimerasa viral que permiten su interferencia en la formación de RNPs activas, disminuyendo, consecuentemente, la transcripción y replicación viral (Li et al., 2011). Curiosamente, en otro estudio previo se mostró la capacidad de Hsp70 para unir complejos de ribonucleoproteína virales, impedir su unión con la

proteína M1 viral, y bloquear la liberación de vRNPs progenies y su exportación nuclear (Hirayama et al., 2004). Se cree que las vRNPs progenie podrían permanecer asociadas a cromatina como mecanismo de retención nuclear previo a la exportación fuera del núcleo celular, y que la capacidad de unión a nucleosomas por parte de la proteína M1 pudiera facilitar dicha exportación. CHD6 podría funcionar de forma análoga a lo ya descrito para Hsp70, e inhibir la liberación al nucleoplasma de vRNPs retenidas en la cromatina. De igual forma a lo descrito para NF90, RBL2 y Hsp70, CHD6 y su capacidad de unir tanto el complejo de ribonucleoproteína como distintas subunidades de la polimerasa viral, podrían interferir en la formación de RNPs activas. El estudio de los mecanismos de inhibición llevados a cabo por moduladores negativos del virus de la gripe servirá para conocer en mayor detalle los puntos de bloqueo celular contra la replicación del virus de la gripe y si estos pueden ser empleados para la generación de posibles terapias antivirales.

## 2. CHD6 cambia su distribución intranuclear y se degrada durante la infección por el virus de la gripe

### 2.1 Redistribución de CHD6 durante la infección por el virus de la gripe: análisis desde el contexto nuclear.

Teniendo en cuenta las interacciones ya indicadas y la relación funcional entre el remodelador de cromatina CHD6 y el virus de la gripe, quisimos conocer a continuación si tienen lugar cambios en CHD6 a nivel de cantidad de proteína y patrón de distribución intranuclear. Como se comentó en la introducción, el núcleo de la célula infectada sufre una importante remodelación que lleva al cambio en el patrón intranuclear de multitud de cuerpos nucleares, como son los PML, los *Nuclear Speckles*, los nucléolos, etc (Josset et al., 2008). Para otros factores asociados a las ribonucleoproteínas virales se han observado cambios en la distribución celular. Es el caso, por ejemplo, de la proteína Hsp70 y el factor de transcripción hCLE que son internalizados al núcleo durante la infección por el virus de la gripe (Li et al., 2011; Pérez-González, 2007). La distribución de CHD6 varía durante la infección

observándose una exclusión de señal fuera de los nucléolos y una disposición en forma de masas granuladas en torno al nucléolo y la periferia nuclear (**Fig. R6**). Es más, el cambio en el patrón parece específico, ya que no ocurre con CHD3, miembro de la subfamilia II de proteínas CHD. Los nucléolos son estructuras nucleares en los que se almacenan multitud de factores de *splicing* y donde tiene lugar el procesamiento de RNAs ribosómicos. Además, son habitualmente diana de diferentes tipos de virus. En el caso concreto del virus de la gripe, la proteína NS1 interacciona con la nucleolina, y se observa una disgregación de los nucléolos durante la infección. Es posible que la necesidad que el virus tiene por conseguir maquinaria de *splicing* sea la responsable final de éste proceso de disgregación. Es también posible que dicha disgregación sea responsable de la exclusión nucleolar de CHD6. Tanto CHD6 como otros miembros de la subfamilia III de CHD han sido localizados en nucléolos a través de estudios proteómicos (Ahmad et al., 2009), lo cual está de acuerdo con su localización nucleolar en análisis por inmunofluorescencia (**Fig. R6** y (Lutz et al., 2006)).

## 2.2 Proceso de degradación de CHD6: similitudes y diferencias con respecto a la degradación de la RNAP II

Además del cambio en el patrón intranuclear, a partir de tiempos intermedios de la infección por el virus de la gripe se induce la degradación de CHD6 (**Fig. R8**). Al igual que la degradación de RNAP II, la acumulación de la proteína CHD6 disminuye a partir de las 6 horas post-infección y alcanza un nivel del 20-40% con respecto al observado en pseudo-infección. La vida media de la proteína CHD6, en torno a 6-9 horas, es bastante similar a lo observado para CHD3, que no se degrada durante la infección (**Fig. R8**). El proceso de degradación de CHD6 muestra un comportamiento análogo a lo ya descrito para la RNAP II (Rodríguez et al., 2007). Es más, esta degradación no es un comportamiento habitual en factores de transcripción asociados a proteínas virales e implicadas en la replicación viral. Por ejemplo, sabemos que DDX5 o SFPQ, factores de *splicing* asociados a RNPs virales, no son degradados, y hCLE no solo no se degrada, sino que aumenta su expresión durante la infección



(Jorba, 2009; Rodríguez, 2009). Teniendo en cuenta que CHD6 es un modulador negativo del virus de la gripe, parece razonable que durante la infección se produzca la degradación del mismo como mecanismo de contra-ataque viral. Sería algo similar a la degradación de la RNAP II, en la que el virus induce su eliminación posiblemente impidiendo la expresión de genes de respuesta antiviral como mecanismo adicional de *shutt-off* celular (Vreede & Fodor, 2010) (**Fig. D1**). Resultados en nuestro laboratorio indican que CHD6 regula un número limitado de genes celulares, ninguno de ellos, excepto NEDD4 que se comentará más adelante, han sido relacionado con el virus de la gripe o la respuesta antiviral (P. Chavez, datos no publicados). No obstante, cabe recordar que todos los miembros de la subfamilia III de CHDs han sido implicados en la regulación de procesos de transcripción de carácter inducible mediados por distintos tipos de estímulos celulares. Es, por lo tanto, plausible que durante la infección por el virus de la gripe CHD6 participe en un programa de expresión génica deletéreo para el virus y que necesite ser inactivado para el correcto progreso de la infección. Sería interesante analizar si la acumulación y distribución de otros moduladores negativos del virus de la gripe también varían durante la infección.

Similar a lo que ocurre con la RNAP II, CHD6 también se degrada, fuera del contexto de infección, en células que solo expresan la polimerasa viral en un proceso que no parece depender del proteosoma celular (**Fig. R13 y R14**). En el caso de la RNAP II, se ha sugerido la implicación de la actividad proteolítica de PA al observarse una menor degradación en células infectadas con el virus mutante PA T157A, que presenta una PA deficiente en esta actividad (Rodríguez et al., 2007). No obstante, otro grupo ha indicado, a través de ensayos con inhibidores del proteosoma, que la degradación de la RNAP II durante la infección por el virus de la gripe sí depende del proteosoma y de la ubiquitinación de RNAP II. En ambos casos, infecciones con virus recombinante PA T157A e infecciones de células tratadas con inhibidores del proteosoma, la replicación viral es sensiblemente inferior a situaciones normales, lo cual dificulta la interpretación de los resultados. En el caso de CHD6, sin embargo, ocurre degradación en ambas situaciones apreciándose tan solo un ligero retraso en el proceso degradativo (**Fig. R13** y datos no mostrados). Estos resultados muestran como la degradación de CHD6 durante la infección por el virus de la gripe no depende del proteosoma ni de la actividad proteolítica de la subunidad PA. Adicionalmente, tanto la degradación como la redistribución intranuclear, no tienen lugar cuando se infectan células con virus de la gripe inactivado con luz ultravioleta (UV), cuando se infecta con

dos virus no relacionados (VSV y Adenovirus), ni cuando se induce stress oxidativo al tratar las células con terc-butilhidroquinona (**Fig. R11** y datos no mostrados). Estos resultados indican que CHD6 es degradado específicamente en la infección por gripe y no en respuesta a otros estímulos en los que ha sido implicado. El hecho de que se observe degradación de CHD6 en células transfectadas con la polimerasa viral, sugiere que tampoco se precisa de una ribonucleoproteína activa para que tenga lugar la degradación. No obstante, se ha observado en estudios recientes como la sola presencia del complejo de la polimerasa viral es suficiente para el bloqueo de la respuesta de interferón, en un mecanismo de *shutt-off* celular independiente de la proteína NS1 (Shapira et al., 2009). Los cambios inducidos en células que expresan el complejo de la polimerasa viral son, por lo tanto, suficientes para inducir la degradación de CHD6.

CHD6 se degrada en células infectadas con distintos tipos de virus de la gripe, tanto en infecciones con cepas de laboratorio como naturales, y con virus de origen humano y aviar. No obstante, otra diferencia notable entre los procesos de degradación de la RNAP II y CHD6 es que éste último también tiene lugar con cepas atenuadas (**Fig. R10**). Recientemente, en nuestro laboratorio se describió que la degradación de la RNAP II no ocurre cuando se infectan células con las cepas atenuadas PR8 y Ann Arbor *cold-adapted*. Debido a su condición de atenuadas, estas cepas son utilizadas actualmente para la generación de vacunas. Sin embargo, en ambos casos sí se produce degradación de CHD6, aunque sensiblemente menor en el caso de Ann Arbor Ca. Curiosamente, la cepa Ann Arbor adaptada a bajas temperaturas es utilizada ampliamente como cepa donadora en la generación de vacunas vivas gripales atenuadas, mientras que PR8 es inactivado en la fabricación de vacunas (Wareing & Tannock, 2001). Sin haberse hecho un estudio comparativo entre ambos virus, este dato parece indicar un mayor atenuación del virus Ann Arbor *cold-adapted* con respecto a PR8, y sugiere una posible correlación entre la degradación de CHD6 y la patogenicidad viral.

Estos resultados se suman a las diferencias anotadas hasta el momento y parecen sugerir que CHD6 es una diana de degradación más sensible que la RNAP II durante la infección por gripe. De acuerdo con estas observaciones, en pulmones de ratones infectados con el virus de la gripe también se observa una reducción significativa de los niveles de CHD6 cuando la replicación del virus y el daño patológico son altos (**Fig. R12**).



### 2.3 Implicación del bloqueo de la transcripción celular en la degradación de la RNAP II y CHD6

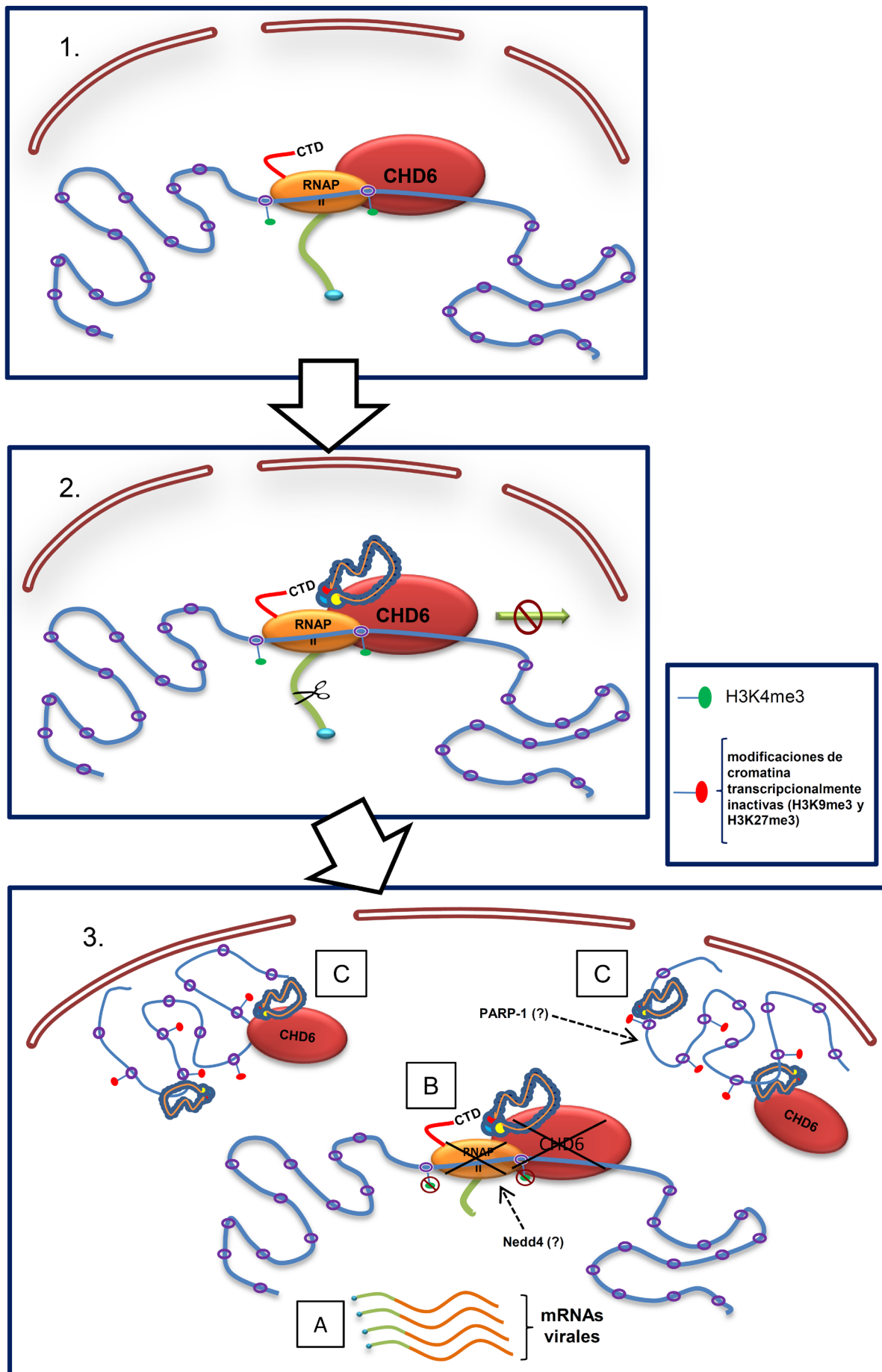
Los experimentos que muestran la degradación de CHD6 con la sola expresión de las subunidades de la polimerasa del virus de la gripe (**Fig. R14**), indican que éste es un proceso activamente inducido por estas proteínas virales fuera del contexto de la infección viral. Es más, el hecho de que la degradación no ocurra con virus VSV que induce, al igual que el virus de la gripe, la inhibición de la transcripción mediada por RNAP II (Yuan et al., 2001), indica que el proceso es específico de la infección por el virus de la gripe y no debida a la inhibición transcripcional inducida (**Fig. R11**).

Datos de esta Tesis y de nuestro laboratorio muestran como la degradación de la proteínas CHD6 y la RNAP II ocurren en presencia del inhibidor del proteosoma MG132, lo cual descarta la implicación de ésta vía de degradación celular en este proceso (**Fig. R13** y (Rodriguez et al., 2007)). En contraposición a éstos resultados, y en relación a la degradación de la RNAP II, datos del laboratorio del Dr. Fodor indican la importancia de la ubiquitinación en el proceso de degradación durante la infección por el virus de la gripe (Vreede et al., 2010). Esta ubiquitinación, probablemente inducida como respuesta al bloqueo transcripcional de la célula infectada, podría cooperar en la degradación de la RNAP II. La degradación de la RNAP II también se ha descrito para otros virus de hebra negativa como los virus *Bunyaviridae* (BUNV), en donde la proteína NSs antagoniza la expresión de genes implicados en la respuesta interferón a través del bloqueo de la RNAP II. Este bloqueo supone la ubiquitinación de la RNAP II y su consiguiente degradación (Thomas et al., 2004; Verbruggen et al., 2011). Por lo tanto, no se pueden descartar la implicación de mecanismos celulares relacionadas con la inhibición transcripcional que cooperan en el proceso de degradación de la RNAP II y, probablemente, CHD6.

En un estudio reciente, se ha caracterizado en mayor detalle el proceso de ubiquitinación de la RNAP II como consecuencia del daño inducido por tratamiento con luz ultravioleta y por tratamiento con alpha-amanitina (Anindya et al., 2007). Se determinó que la ubiquitinación de la RNAP II es la responsable de su degradación, estando implicado en este proceso la ligasa E3 ubiquitina NEDD4 (*Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-regulated 4*). NEDD4 ha sido descrita previamente como modulador de las etapas tempranas de la infección por VIH y, además, un factor asociado a ésta proteína, la N4BP2 (*NEDD4 Binding Protein 2*), ha sido identificada como proteína requerida en la infección por el virus de la gripe (Konig et al., 2010; Sui et al., 2009). Es interesante destacar que datos preliminares en nuestro laboratorio muestran como células con CHD6 silenciada expresan mayor cantidad de mensajero de NEDD4 (P. Chavez, datos no publicados). Sería interesante conocer si NEDD4 también se sobreexpresa en células infectadas por el virus de la gripe como consecuencia de la disminución de los niveles de acumulación de CHD6 dada su degradación, y, en caso afirmativo, si esta sobreexpresión está relacionada con el proceso de ubiquitinación de la polimerasa celular.

Recientemente, también se han implicado las proteínas celulares asociadas a la polimerasa viral, PARP-1 y DDB1 (Mayer et al., 2007), en el proceso de eliminación de la RNAP II bloqueada en elongación como consecuencia del daño inducido por tratamiento con luz ultravioleta (Chou et al., 2010; O'Connell & Harper, 2007). Es más, el proceso de eliminación de la RNAP II de la zona dañada llevado a cabo por PARP-1 ocurre en un proceso independiente del proteosoma. En esta situación, PARP-1 actúa como factor esencial para el reclutamiento de numerosa maquinaria que permite la formación de cromatina inactiva como mecanismo de silenciamiento transcripcional (Chou et al., 2010). Una posible hipótesis es que tanto la degradación de la RNAP II y CHD6, como la relocalización de CHD6 a cromatina inactiva, sean producto de un efecto cooperativo entre la actuación de las ribonucleoproteínas del virus de la

**Figura D2. Modelo representativo de la posible interrelación entre la maquinaria de transcripción celular, el remodelador de cromatina CHD6, la polimerasa del virus de la gripe y las regiones de cromatina transcripcionalmente activas o inactivas, durante el proceso de infección por el virus de la gripe. (1)** Representación gráfica que muestra la RNAP II en el proceso de síntesis de un mensajero celular (línea verde con punto azul claro representando la estructura *cap*) a partir de un gen situado en el contexto de la cromatina celular (línea azul con círculos huecos morados representando los nucleosomas) y en presencia del remodelador de cromatina CHD6. **(2)** Durante la infección por el virus de la gripe se produce el acoplamiento de las vRNPs con la maquinaria de transcripción celular que podría facilitar su acceso a estructuras *cap* y a la maquinaria de *splicing* para llevar a cabo la transcripción viral. **(3)** Una vez que la síntesis de mensajeros virales ha finalizado **(A)**, la polimerasa del virus de la gripe induce la degradación de la RNAP II y de CHD6 con la posible cooperación de factores celulares **(B)**. Los niveles de H3K4me3 también se reducen durante la infección probablemente como resultado del proceso de degradación de la maquinaria transcripcional **(B)**. Concomitante a estos cambios, las vRNPs son acumuladas, junto a CHD6, en regiones periféricas del núcleo celular ricas en cromatina inactiva, **(C)**, y que podrían servir como regiones de almacenamiento de vRNPs progenies previo a su transporte fuera del núcleo celular.



gripe y mecanismos de respuesta celular al bloqueo transcripcional inducido durante la infección (ver Fig. D2).

### 3. Relocalización de CHD6 en cromatina transcripcionalmente inactiva

#### 3.1 El virus de la gripe, CHD6 y cromatina celular: ¿dónde mirar?

Las proteínas de la familia CHD presentan cromodominios que se han descrito como módulos de interacción a motivos de metilación en residuos de lisina de colas de histonas. Dentro de este amplio rango de posibles ligandos, los cromodominios de los miembros de la familia CHD presentan una capacidad de unión diferencial dependiendo de la subfamilia. La subfamilia III, dentro de la cual se incluye CHD6, presenta ejemplos de proteínas capaces de unir H3K9me3 y/o H3K4me. Para conocer el patrón normal de asociación de CHD6 y si éste variaba durante la infección por el virus de la gripe, decidimos realizar ensayos de *pull-down* utilizando péptidos sintéticos biotinilados que representan los extremos amino-terminal de la cola de histona 3.

Se decidió utilizar los marcadores epigenéticos H3K9me3, H3K27me3 y H3K4me3 en el ensayo de *pull-down*, y en otros ensayos posteriores, por varias razones: 1) funcionalmente, las metilaciones de histonas parecen servir como plataformas de unión que permiten el reclutamiento de muy diversa maquinaria celular; 2) Son modificaciones más estables que otros marcadores como fosforilación, acetilación, etc.; 3) las tres modificaciones pueden ser unidas por cromodominios de distintos remodeladores de cromatina y, como ya se ha indicado, son probables ligandos de los cromodominios de CHD6; 4) representan marcadores con una fuerte correlación con regiones transcripcionalmente activas (en el caso de H3K4me3) y regiones transcripcionalmente inactivas (para H3K9me3 y H3K27me3); y 5) son marcadores que han sido vinculados a diferentes tipos de virus. Intentos negativos de expresión y purificación de los cromodominios de CHD6 han impedido realizar los ensayos de *pull-down* sobre éstas estructuras aisladas (T. Lutz, resultados no mostrados), por ello utilizamos, alternativamente,

extractos nucleares de células pseudo-infectas e infectadas con el virus de la gripe.

Aunque para varios miembros de la subfamilia III se ha mostrado una correlación entre el patrón de unión a marcadores de sus cromodominios y su distribución en cromatina *in vivo*, también es posible que la unión a cromatina esté determinada por las otras proteínas que forman parte de los complejos remodeladores. Es más, en células infectadas, CHD6 interacciona con las RNPs virales que, a su vez, presentan capacidad por unir la cromatina. Luego es probable que la asociación a cromatina del factor CHD6 durante la infección no esté determinado por sus cromodominios. Un nivel de dificultad añadido, es la presencia en la zona carboxilo-terminal de la proteína CHD6 de un dominio SANT que también ha sido descrito como módulo de interacción a colas de histonas.

#### 3.2 Solo la infección por el virus de la gripe induce el reclutamiento de CHD6 a varios de los marcadores epigenéticos utilizados

Los resultados de los ensayos de *pull-down*, muestran como CHD6 no une de forma específica ninguno de los marcadores en condiciones de pseudo-infección (Fig. R16-A). No obstante, a tiempos intermedios de infección (6 horas-post infección) se aprecia un mayor enriquecimiento de CHD6 en marcadores de cromatina reprimida transcripcionalmente (es decir, H3K9me3 y H3K27me3) (figura R16-B).

Una posible interpretación de estos resultados viene dada por un trabajo reciente en el que se expone un mecanismo de reclutamiento a cromatina de complejos remodeladores ISWI, y que también podría darse para otros remodeladores de cromatina (Erdel et al., 2010). A través del análisis de células *in vivo* por microscopía de fluorescencia, se observó como los complejos se encuentran continuamente “tanteando” nucleosomas que unen de forma aleatoria y solo transitoriamente. No obstante, cuando el remodelador reconoce una determinada señal (por ejemplo una modificación post-traducciona de histona concreta, o una vía de señalización celular) se establece una interacción más duradera con la cromatina. Se utiliza el ejemplo de la reparación del daño a DNA y observan cómo, solo cuando se induce daño al DNA, el complejo remodelador pasa de una unión aleatoria y transitoria a nucleosomas a una unión fuerte y específica a marcadores de cromatina enriquecidos en la región dañada (Erdel et al., 2010). Es posible que para CHD6 la situación en pseudo-infección



represente una unión inespecífica a los distintos marcadores como producto de la interacción aleatoria y transitoria mencionada. Al igual que los remodeladores de cromatina utilizados en estos estudios, y como ya se ha destacado anteriormente, CHD6 y otros muchos miembros de la familia CHD participan en numerosos procesos biológicos inducibles en los que solo son reclutados cuando un estímulo determinado permite la activación de una determinada señal (daño a DNA, replicación celular, diferenciación, etc.). Es más, a nivel transcripcional han sido descritos muchos de ellos como cofactores transcripcionales que interaccionan con receptores nucleares activados por estímulos concretos (PPARs, stress oxidativo,  $\beta$ -catenina, etc.). Es posible que en ausencia de estos estímulos la asociación de estas proteínas con la cromatina sea transitoria e inespecífica. La infección podría considerarse como otro estímulo en el núcleo de la célula que resulta en un reclutamiento estable de CHD6 a cromatina transcripcionalmente inactiva.

### 3.3 NP también se une a regiones ricas en H3K9me3: implicaciones funcionales de esta asociación

Curiosamente, los mismos ensayos de *pull-down* muestran, al igual que lo observado para CHD6, una mayor acumulación de la proteína viral NP en marcadores de cromatina inactiva (**Fig. R16-B**). Estos ensayos se realizaron a 6 horas-post infección cuando ya se observa re-localización intranuclear de CHD6 y todavía es mínima su degradación (**Figs. R6 y R8**). Adicionalmente, en este momento de la infección la elongación mediada por la RNAP II ha sido bloqueada y se procede también a la degradación de la polimerasa celular (Chan et al., 2006; Rodríguez et al., 2007). Varios ensayos han determinado como en este tiempo la generación de mensajero viral ha alcanzado su máximo mientras que la replicación de vRNPs continua (Robb et al., 2009; Rodríguez et al., 2009; Rodríguez et al., 2007; Shapiro et al., 1987). Luego a tiempos intermedios de infección el virus incentiva el bloqueo de la maquinaria celular mientras genera múltiples copias de vRNA progenie (**ver Fig. D1**). Se ha propuesto que estas vRNPs permanecen unidas a cromatina hasta su liberación al nucleoplasma y exportación al citosol. Es posible que la unión a cromatina sea a través de la heterocromatina (regiones enriquecidas con los marcadores H3K9me3 y H3K27me3) que suele encontrarse acumulada en las regiones alrededor de nucléolos y en la periferia del núcleo. Por otro lado, los efectos observados *in vitro* han sido confirmados por ensayos de co-localización a través del uso de microscopía de fluorescencia

(**Figs. R17 y 18**).

¿Cuál sería la razón por la que NP, y presuntamente las vRNPs, unen heterocromatina? Una idea atractiva es que el virus de la gripe, a través de su asociación con H3K9me3, utilice la heterocromatina como plataforma dinámica que le permita el reclutamiento y movilización de las vRNPs progenie sintetizadas durante la replicación viral. Esta posibilidad podría concordar con nuevos estudios que inciden en el alto dinamismo de ésta estructura y que contradicen la percepción de la heterocromatina como una región “inerte” del núcleo (Cam et al., 2009; Grewal & Jia, 2007). En contra de ésta hipótesis, durante la infección no observamos ninguna alteración aparente en la distribución intranuclear del marcador H3K9me3 (**Fig. R15**).

### 3.4 CHD6 y NP en cromatina inactiva: posibles mecanismos de reclutamiento

Ambos, CHD6 y NP viral, se encuentran presentes en heterocromatina a tiempos intermedios de infección. Independientemente de las implicaciones funcionales de estas asociaciones, quisimos saber si CHD6, como proteína perteneciente a una familia de remodeladores de cromatina que pueden movilizar ésta estructura y facilitar el acceso a diversa maquinaria celular, es responsable del reclutamiento de NP a cromatina inactiva. Para CHD7 se ha descrito su capacidad por unir tanto H3K4me3 como H3K9me3, lo cual sugiere su implicación en procesos de activación y represión transcripcional. Datos preliminares en nuestro laboratorio destacan la capacidad de CHD6 para modular positiva y negativamente la transcripción de varios genes celulares (P. Chavez, datos no publicados). Por lo tanto, CHD6 podría servir, a través de su asociación a cromatina inactiva durante la infección por el virus de la gripe, como plataforma de reclutamiento de NP viral a estas estructuras.

Sin embargo, la asociación de NP a heterocromatina no depende de la presencia de CHD6 (**Fig. R19**). Estos resultados favorecen un mecanismo de asociación a cromatina en el que el virus de la gripe, a través de la unión de NP viral a heterocromatina, induce el reclutamiento de CHD6 a ésta región de cromatina inactiva (**ver Fig. D2**). De acuerdo con este planteamiento, estudios preliminares muestran como NP expresada sola, fuera del contexto de infección, sigue siendo capaz de unir, preferentemente, cromatina inactiva (datos no mostrados). Es más, NP, en infección o sobreexpresada sola, se acumula en la periferia del

núcleo (donde se encuentra enriquecida la estructura de heterocromatina), lo cual ha permitido sugerir su participación en la adopción de una conformación intranuclear afín a la salida del genoma viral fuera del núcleo (fenómeno denominado “*Genome Gating*”) (Elton et al., 2005a).

### 3.5 El reclutamiento de proteínas nucleares en regiones transcripcionalmente reprimidas como posible mecanismo de inactivación funcional.

No se puede obviar la verdadera esencia de la heterocromatina. Como ya se explicó en la introducción, la heterocromatina constituye una forma única de cromatina caracterizada por su estado transcripcionalmente reprimido y por su estructura altamente condensada. Salvo ciertas excepciones, H3K9me3 y H3K27me3 representan marcadores de cromatina inactiva que se acumulan en genes transcripcionalmente reprimidos. Como tales, la acumulación de CHD6 en estas regiones durante la infección puede interpretarse como un mecanismo de represión dirigido hacia la actividad transcripcional mediada por CHD6. Su acumulación diferencial en cromatina inactiva, junto al proceso indicado de degradación, están de acuerdo con la descripción de CHD6 como modulador negativo de la replicación viral y la necesidad de ser inactivado durante la infección. Una interesante posibilidad es que el reclutamiento de CHD6 a cromatina inactiva sirva como mecanismo de inactivación funcional que puede contribuir al *shutt-off* transcripcional inducido durante la infección por el virus de la gripe (Fig. D1 y D2).

En este sentido, sería muy interesante saber si otras proteínas asociadas a cromatina, factores de transcripción, u otro tipo de proteínas nucleares que han sido descritas como factores implicados en la replicación del virus de la gripe, también son reclutadas a heterocromatina durante la infección. En relación a factores asociados a cromatina tenemos, por ejemplo, el caso ya mencionado de TRIM28/KAP1, que presenta diversos dominios que le permiten unir cromatina, y que ha sido descrito como factor relacionado con muchos de los procesos en los que también participa CHD6. Otra proteína asociada a cromatina que regula el ciclo replicativo del virus de la gripe es la proteína PHF2. PHF2 contiene una interesante combinación de dominios relacionados con la unión a cromatina, entre los que se incluyen un dominio PHD *finger* (dominio “lector”), que interacciona con la marca H3K4me3, y un dominio efector Jumonji-C (JMJC) (dominio “borrador”) (Fortschegger & Shiekhattar, 2011).

## 4. Reducción en los niveles de H3K4me3 y su posible implicación en shut-off viral

### 4.1 La reducción en H3K4me3 ocurre concomitante a las degradaciones de CHD6 y RNAP II

Estudios realizados en células infectadas con el virus de la gripe, han mostrado como: 1) la elongación de la transcripción celular se encuentra inhibida a tiempos tempranos de la infección (Chan et al., 2006); 2) durante la infección se produce la degradación de la RNAP II a tiempos intermedios de infección, incluyendo su forma de elongación y la forma hipofosforilada que se acumula en la región promotora de genes activos (Rodríguez et al., 2009; Rodríguez et al., 2007; Vreede et al., 2010); 3) la polimerasa viral se une a la RNAP II y se acumula en la región promotora de genes activos (Chan et al., 2006; Engelhardt et al., 2005); 4) la degradación de la RNAP II coincide con el final de la transcripción viral y, obviamente, con la parada de la transcripción celular (Rodríguez et al., 2009; Rodríguez et al., 2007; Shapiro et al., 1987); 5) otros factores relacionados con transcripción, como CHD6, son también degradados durante la infección (Fig. R8). Teniendo en cuenta todos estos datos que revelan una importante alteración de la maquinaria de transcripción mediada por la RNAP II, quisimos saber si se producían alteraciones en alguno de los marcadores, tanto a nivel de acumulación como a nivel de distribución intranuclear. Ninguno de los marcadores muestra cambios en el patrón intranuclear, y los análisis de acumulación por *Western blot* sí indicaron una ligera pero reproducible bajada en los niveles de H3K4me3 (Fig. R15). La bajada, a 12 horas-post infección, es de aproximadamente el 35% con respecto a los niveles observados en pseudo-infección. El hecho de que ninguno de los otros marcadores cambie, ni tampoco los niveles de histona 3 total analizado con un anticuerpo que reconoce la cola de la histona 3 independientemente de motivos post-traduccionales, indica que las colas de histonas permanecen íntegras durante la infección y que el proceso de eliminación es específico del motivo trimetilado en el residuo de lisina H3K4.

Las metilaciones en colas de histonas, que han sido consideradas durante largo tiempo como procesos irreversibles con una vida media igual al tiempo de reciclaje de la histona entera, han sido descritas en los últimos 5-10 años como estructuras sorprendentemente dinámicas que pueden ser alteradas por la acción de metilasas

y demetilasas (Shilatifard, 2006). El alto número de operaciones minuciosamente coreografiadas incluidas en los procesos de transcripción y *splicing* celulares requieren, igualmente, de un control riguroso en la metilación y demetilación de residuos específicos. La demetilación en el residuo H3K4 trimetilado durante la infección por el virus de la gripe puede ser debido a la activación global de enzimas demetilasas específicas de éste residuo. Esto sería algo similar a lo que ocurre durante la infección por papillomavirus, en la que se produce una sobreexpresión de demetilasas específicas que inducen una reducción global del residuo H3K27 trimetilado (McLaughlin-Drubin et al., 2011).

Datos en levadura han indicado que para que tenga lugar la metilación del residuo H3K4, es importante el reclutamiento de la metiltransferasa específica del residuo H3K4, Set1, al complejo de la RNAP II fosforilada en serina 5 (implicada en la iniciación transcripcional). La eliminación durante la infección por el virus de la gripe de la maquinaria de transcripción necesaria para que tenga lugar la metilación del residuo H3K4, puede también ser responsable de la reducción de sus niveles. Sería interesante saber que metilasas o demetilasas podrían estar implicados en este proceso.

#### 4.2 ¿El virus de la gripe manipula epigenéticamente la transcripción de la célula huésped?

Una idea muy atractiva en relación a este proceso es que el virus de la gripe pudiera manipular o reprogramar epigenéticamente la célula huésped. La reprogramación epigenética global de la célula infectada ha sido descrito en varios virus DNA persistentes que provocan la transformación celular e inducen cambios oncogénicos. El caso más extremo descrito hasta el momento, es la manipulación epigenética que provoca Adenovirus y que incluye una reducción global del 70% en la acetilación del residuo H3K18 (Ferrari et al., 2008; Horwitz et al., 2008). Sorprendentemente, esta reducción se consigue sobreexpresando sola la proteína viral e1a de 243 aminoácidos, y en el proceso son fundamentales su asociación con la región promotora de los genes que regula, y su interacción específica con el complejo acetiltransferasa p300/CBP. Adicionalmente, se ha

descrito la manipulación que induce E4-ORF3, otra proteína pequeña de adenovirus, en la represión de genes regulados por p53 (Soria et al., 2010). En este caso se describe como la sobreexpresión de ésta proteína viral induce la reorganización de regiones ricas en H3K9me3 formando una especie de “red” intranuclear en la que quedarían atrapados los genes diana de p53. En ambos trabajos se describe como solo dos proteínas virales provocan una importante manipulación de la transcripción celular que permite la activación y represión de genes para el beneficio de adenovirus. Otro ejemplo de virus que altera globalmente la acumulación de modificaciones de histonas es la manipulación epigenética impuesta por la oncoproteína E7 del papilomavirus humano HPV16. E7 de HPV16 provoca la reducción global de la metilación del residuo H3K27me3, relacionado con represión transcripcional (McLaughlin-Drubin et al., 2011). E7 induce la expresión de las H3K27me3 demetilasas, KDM6A y KDM6B, contribuyendo a la reprogramación de la célula huésped.

Se ha sugerido que la polimerasa del virus de la gripe induce los cambios sobre la maquinaria transcripcional celular a través de su asociación con el dominio carboxilo-terminal de la RNAP II (Vreede & Fodor, 2010). Es más, ensayos de inmunoprecipitación han mostrado como la polimerasa viral se encuentra asociada principalmente en el extremo 5' del ORF de los genes celulares, donde se cree podría secuestrar maquinaria celular que precisa para sus actividades (Chan et al., 2006). Es posible que, una vez que no se requiera más transcripción celular, la polimerasa viral asociada en la región 5' del gen no solo induzca la degradación de la RNAP II, sino también la disminución de H3K4me3 como mecanismo adicional del bloqueo de la transcripción celular (ver **Figs. D1 y D2**).

Las preguntas abiertas en esta discusión surgen en el momento en el que se considera la cromatina como posible factor modulador del ciclo viral en su fase nuclear. A pesar de haber sido una estructura ampliamente ignorada en el estudio de la infección por gripe, la importancia que la cromatina tiene en procesos celulares vitales para el correcto progreso de la infección viral, hace inevitable su integración en futuros estudios en relación a éste patógeno.





# CONCLUSIONES

1. - CHD6 interacciona con las subunidades PA y PB2 de forma individual, con el complejo de la polimerasa viral en infección, y colocaliza con las RNPs virales en el núcleo de células infectadas.
2. - El silenciamiento de CHD6 produce un ligero aumento en la actividad de las RNPs virales y aumenta el título del virus correlativamente a la disminución de los niveles de CHD6 en las células infectadas.
3. - La distribución intranuclear de CHD6 cambia durante la infección por el virus de la gripe a un patrón más granulado excluido de los nucleolos. Este cambio no parece ser debido al bloqueo en la transcripción celular que tiene lugar en células infectadas.
4. - La infección por el virus de la gripe produce la degradación específica de CHD6 tanto en células de cultivo como en tejido de pulmón de ratón infectado.
5. - Esta degradación ocurre con todas las cepas de laboratorio y aislados naturales analizados, incluyendo cepas atenuadas que no degradan la RNAP II celular, y no tiene lugar en infecciones por VSV y Adenovirus. La cepa A/Ann Arbor/6/60 *cold-adapted*, utilizada ampliamente como cepa donadora en la generación de vacunas vivas gripales atenuadas, induce una menor degradación de CHD6.
6. - La expresión del complejo de la polimerasa viral es suficiente para inducir la degradación de CHD6 y ocurre en presencia de un inhibidor de la vía de degradación del proteosoma.
7. - Durante la infección por el virus de la gripe CHD6 es reclutado a cromatina transcripcionalmente inactiva, junto a la proteína NP viral. CHD6 no media la acumulación de NP en cromatina inactiva.
8. - La infección por el virus de la gripe induce una reducción en los niveles de H3K4me3, marcador de cromatina transcripcionalmente activa.





# BIBLIOGRAFÍA

1. Aasland, R., Stewart, A.F., Gibson, T., 1996. The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem Sci* 21, 87-88.
2. Abramson, J., Giraud, M., Benoist, C., Mathis, D., 2010. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* 140, 123-135.
3. Adams, C.C., Workman, J.L., 1993. Nucleosome displacement in transcription. *Cell* 72, 305-308.
4. Ahmad, Y., Boisvert, F.M., Gregor, P., Cobley, A., Lamond, A.I., 2009. NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic acids research* 37, D181-184.
5. Ahmed, M., Lyles, D.S., 1998. Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on transcription directed by host RNA polymerases I, II, and III. *J Virol* 72, 8413-8419.
6. Akkina, R.K., Chambers, T.M., Londo, D.R., Nayak, D.P., 1987. Intracellular localization of the viral polymerase proteins in cells infected with influenza virus and cells expressing PB1 protein from cloned cDNA. *J Virol* 61, 2217-2224.
7. Ali, A., Avalos, R.T., Ponimaskin, E., Nayak, D.P., 2000. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol* 74, 8709-8719.
8. Allen, M.D., Religa, T.L., Freund, S.M., Bycroft, M., 2007. Solution structure of the BRK domains from CHD7. *J Mol Biol* 371, 1135-1140.
9. Ammermann, I., Bruckner, M., Matthes, F., Iftner, T., Stubenrauch, F., 2008. Inhibition of transcription and DNA replication by the papillomavirus E8-E2C protein is mediated by interaction with corepressor molecules. *J Virol* 82, 5127-5136.
10. Amorim, M.J., Digard, P., 2006. Influenza A virus and the cell nucleus. *Vaccine* 24, 6651-6655.
11. Amorim, M.J., Read, E.K., Dalton, R.M., Medcalf, L., Digard, P., 2007. Nuclear export of influenza A virus mRNAs requires ongoing RNA polymerase II activity. *Traffic* 8, 1-11.
12. Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K., Lam, Y.W., Steen, H., Mann, M., Lamond, A.I., 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* 12, 1-11.
13. Anindya, R., Aygun, O., Svejstrup, J.Q., 2007. Damage-induced ubiquitylation of human RNA polymerase II by the ubiquitin ligase Nedd4, but not Cockayne syndrome proteins or BRCA1. *Mol Cell* 28, 386-397.
14. Aragón, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortín, J., Nieto, A., 2000. Eukaryotic translation initiation factor 4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Molecular and cellular biology* 20, 6259-6268.
15. Area, E., Martín-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L., Ortín, J., 2004. 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 308-313.

16. Argos, P., 1988. A sequence motif in many polymerases. *Nucleic acids research* 16, 9909-9916.
17. Avalos, R.T., Yu, Z., Nayak, D.P., 1997. Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J Virol* 71, 2947-2958.
18. Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., Kouzarides, T., 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-124.
19. Bárcena, J., Ochoa, M., de la Luna, S., Melero, J.A., Nieto, A., Ortín, J., Portela, A., 1994. Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J Virol* 68, 6900-6909.
20. Barrett, T., Wolstenholme, A.J., Mahy, B.W., 1979. Transcription and replication of influenza virus RNA. *Virology* 98, 211-225.
21. Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K., 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.
22. Batsukh, T., Pieper, L., Koszucka, A.M., von Velsen, N., Hoyer-Fender, S., Elbracht, M., Bergman, J.E., Hoefsloot, L.H., Pauli, S., 2010. CHD8 interacts with CHD7, a protein which is mutated in CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet* 19, 2858-2866.
23. Baudin, F., Bach, C., Cusack, S., Ruigrok, R.W., 1994. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *The EMBO journal* 13, 3158-3165.
24. Beato, M., Eisfeld, K., 1997. Transcription factor access to chromatin. *Nucleic acids research* 25, 3559-3563.
25. Becker, P.B., Hörz, W., 2002. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 247-273.
26. Berger, S.L., 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412.
27. Bernat, A., Avvakumov, N., Mymryk, J.S., Banks, L., 2003. Interaction between the HPV E7 oncoprotein and the transcriptional coactivator p300. *Oncogene* 22, 7871-7881.
28. Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L., Lander, E.S., 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120, 169-181.
29. Biswas, S.K., Boutz, P.L., Nayak, D.P., 1998. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *Journal of Virology* 72, 5493-5501.
30. Biswas, S.K., Nayak, D., 1996. Influenza virus polymerase basic protein 1 interacts with influenza virus polymerase basic protein 2 at multiple sites. *Journal of Virology* 70, 6716-6722.
31. Biswas, S.K., Nayak, D.P., 1994. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *Journal of Virology* 68, 1819-1826.
32. Blaas, D., Patzelt, E., Keuchler, E., 1982. Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucl. Acids Res.* 10, 4803-4812.
33. Bouazoune, K., Mitterweger, A., Langst, G., Imhof, A., Akhtar, A., Becker, P.B., Brehm, A., 2002. The dMi-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization. *The EMBO journal* 21, 2430-2440.
34. Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R.W., Baudin, F., 2007. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res* 124: 12-21.
35. Bouloy, M., Plotch, S.J., Krug, R.M., 1978. Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 4886-4890.
36. Boyer, L.A., Langer, M.R., Crowley, K.A.,

- Tan, S., Denu, J.M., Peterson, C.L., 2002. Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol Cell* 10, 935-942.
37. Boyer, L.A., Latek, R.R., Peterson, C.L., 2004. The Sant domain: a unique histone-tail-binding modules? . *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 158-163.
  38. Braam, J., Ulmanen, I., Krug, R.M., 1983. Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* 34, 609-618.
  39. Brass, A.L., Huang, I.C., Benita, Y., John, S.P., Krishnan, M.N., Feeley, E.M., Ryan, B.J., Weyer, J.L., van der Weyden, L., Fikrig, E., Adams, D.J., Xavier, R.J., Farzan, M., Elledge, S.J., 2009. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 139, 1243-1254.
  40. Brehm, A., Nielsen, S.J., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., Kouzarides, T., 1999. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *The EMBO journal* 18, 2449-2458.
  41. Brummelkamp, T.R., Bernards, R., Agami, R., 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science (New York, N.Y)* 296, 550-553.
  42. Bryant, K.F., Colgrove, R.C., Knipe, D.M., 2011. Cellular SNF2H Chromatin-Remodeling Factor Promotes Herpes Simplex Virus 1 Immediate-Early Gene Expression and Replication. *MBio* 2.
  43. Bui, M., Eills, E.G., Helenius, A., Whittaker, G.R., 2000. Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J Virol* 74, 1781-1786.
  44. Bukrinskaya, A.K., Vorkunova, G.K., Vorkunova, N.K., 1979. Cytoplasmic and nuclear input virus RNPs in influenza virus-infected cells. *The Journal of general virology* 45, 557-567.
  45. Burgui, I., Aragon, T., Ortin, J., Nieto, A., 2003. PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *The Journal of general virology* 84, 3263-3274.
  46. Bushman, F., Lewinski, M., Ciuffi, A., Barr, S., Leipzig, J., Hannenhalli, S., Hoffmann, C., 2005. Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat Rev Microbiol* 3, 848-858.
  47. Bushman, F.D., Hoffmann, C., Ronen, K., Malani, N., Minkah, N., Rose, H.M., Tebas, P., Wang, G.P., 2008. Massively parallel pyrosequencing in HIV research. *AIDS* 22, 1411-1415.
  48. Caldon, C.E., Sergio, C.M., Schutte, J., Boersma, M.N., Sutherland, R.L., Carroll, J.S., Musgrove, E.A., 2009. Estrogen regulation of cyclin E2 requires cyclin D1 but not c-Myc. *Molecular and cellular biology* 29, 4623-4639.
  49. Cam, H.P., Chen, E.S., Grewal, S.I., 2009. Transcriptional scaffolds for heterochromatin assembly. *Cell* 136, 610-614.
  50. Cianci, C., Tiley, L., Krystal, M., 1995. Differential activation of the influenza virus polymerase via template RNA binding. *J Virol* 69, 3995-3999.
  51. Clement, J.Q., Wilkinson, M.F., 2000. Rapid induction of nuclear transcripts and inhibition of intron decay in response to the polymerase II inhibitor DRB. *J Mol Biol* 299, 1179-1191.
  52. Coloma, R., Valpuesta, J.M., Arranz, R., Carrascosa, J.L., Ortin, J., Martin-Benito, J., 2009. The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog* 5.
  53. Compans, R.W., Chopin, P.W., 1975. Reproduction of Myxoviruses, in: H. Fraenkel-Conrat, Wagner R.R. (Ed.), *Comprehensive Virology*. Plenum Press, New York, 179-252.
  54. Cui, K., Tailor, P., Liu, H., Chen, X., Ozato, K., Zhao, K., 2004. The chromatin-remodeling BAF complex mediates cellular antiviral activities by promoter priming. *Molecular and cellular biology* 24, 4476-4486.
  55. Chan, A.Y., Vreede, F.T., Smith, M., Engelhardt, O.G., Fodor, E., 2006. Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation. *Virology* 351, 210-217.

56. Chelbi-Alix, M.K., Quignon, F., Pelicano, L., Koken, M.H., de The, H., 1998. Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. *J Virol* 72, 1043-1051.
57. Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature medicine* 7, 1306-1312.
58. Chen, Z., Li, Y., Krug, R.M., 1999. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *The EMBO journal* 18, 2273-2283.
59. Chou, D.M., Adamson, B., Dephoure, N.E., Tan, X., Nottke, A.C., Hurov, K.E., Gygi, S.P., Colaiacovo, M.P., Elledge, S.J., 2010. A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 18475-18480.
60. de la Luna, S., Fortes, P., Beloso, A., Ortín, J., 1995. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol* 69, 2427-2433.
61. de la Luna, S., Martín, J., Portela, A., Ortín, J., 1993. Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from SV40 recombinant viruses. *Journal of General Virology* 74, 535-539.
62. Deng, T., Sharps, J., Fodor, E., Brownlee, G.G., 2005. In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol* 79, 8669-8674.
63. Dias, A., Bouvier, D., Crepin, T., McCarthy, A.A., Hart, D.J., Baudin, F., Cusack, S., Ruigrok, R.W., 2009. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458, 914-918.
64. Digard, P., Blok, V.C., Inglis, S.C., 1989. Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* 171, 162-169.
65. Doan, L., Handa, B., Roberts, N.A., Klumpp, K., 1999. Metal ion catalysis of RNA cleavage by the influenza virus endonuclease. *Biochemistry* 38, 5612-5619.
66. Doerks, T., Copley, R.R., Schultz, J., Ponting, C.P., Bork, P., 2002. Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions. *Genome Res* 12, 47-56.
67. Easley, R., Van Duyne, R., Coley, W., Guendel, I., Dadgar, S., Kehn-Hall, K., Kashanchi, F., 2010. Chromatin dynamics associated with HIV-1 Tat-activated transcription. *Biochimica et biophysica acta* 1799, 275-285.
68. Egyhazi, E., 1976. Initiation inhibition and reinitiation of the synthesis of heterogenous nuclear RNA in living cells. *Nature* 262, 319-321.
69. Elton, D., Amorim, M.J., Medcalf, L., Digard, P., 2005a. 'Genome gating'; polarized intranuclear trafficking of influenza virus RNPs. *Biol Lett* 1, 113-117.
70. Elton, D., Digard, P., Tiley, L., Ortín, J., 2005b. Structure and function of the influenza virus RNP. Horizon Scientific Press, Norfolk.
71. Elton, D., Simpson-Holley, M., Archer, K., Medcalf, L., Hallam, R., McCauley, J., Digard, P., 2001. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* 75, 408-419.
72. Engelhardt, O.G., Smith, M., Fodor, E., 2005. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol* 79, 5812-5818.
73. Erdel, F., Schubert, T., Marth, C., Langst, G., Rippe, K., 2010. Human ISWI chromatin-remodeling complexes sample nucleosomes via transient binding reactions and become immobilized at active sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 19873-19878.
74. Falcón, A., Marión, R., Zürcher, T., Gomez,



- P., Portela, A., Nieto, A., Ortín, J., 2004. Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *Journal of Virology* 78, 3880-3888.
75. Fernandez-Sesma, A., 2007. The influenza virus NS1 protein: inhibitor of innate and adaptive immunity. *Infect Disord Drug Targets* 7, 336-343.
  76. Ferrari, R., Berk, A.J., Kurdistani, S.K., 2009. Viral manipulation of the host epigenome for oncogenic transformation. *Nat Rev Genet* 10, 290-294.
  77. Ferrari, R., Pellegrini, M., Horwitz, G.A., Xie, W., Berk, A.J., Kurdistani, S.K., 2008. Epigenetic reprogramming by adenovirus e1a. *Science (New York, N.Y)* 321, 1086-1088.
  78. Fertey, J., Ammermann, I., Winkler, M., Stoger, R., Iftner, T., Stubenrauch, F., 2010. Interaction of the papillomavirus E8-E2C protein with the cellular CHD6 protein contributes to transcriptional repression. *J Virol* 84, 9505-9515.
  79. Flanagan, J.F., Blus, B.J., Kim, D., Clines, K.L., Rastinejad, F., Khorasanizadeh, S., 2007. Molecular implications of evolutionary differences in CHD double chromodomains. *J Mol Biol* 369, 334-342.
  80. Flanagan, J.F., Mi, L.Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., Khorasanizadeh, S., 2005. Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* 438, 1181-1185.
  81. Fodor, E., Smith, M., 2004. The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol* 78, 9144-9153.
  82. Fortes, P., Beloso, A., Ortín, J., 1994. Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks RNA nucleocytoplasmic transport. *The EMBO J* 13, 704-712.
  83. Fortes, P., Lamond, A.I., Ortín, J., 1995. Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. *Journal of General Virology* 76, 1001-1007.
  84. Fortschegger, K., Shiekhataar, R., 2011. Plant homeodomain fingers form a helping hand for transcription. *Epigenetics* 6, 4-8.
  85. Fujii, K., Fujii, Y., Noda, T., Muramoto, Y., Watanabe, T., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T., Kawaoka, Y., 2005. Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* 79, 3766-3774.
  86. Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T., Kawaoka, Y., 2003. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2002-2007.
  87. Gallastegui, E., Millan-Zambrano, G., Terme, J.M., Chavez, S., Jordan, A., 2011. Chromatin Reassembly Factors Are Involved in Transcriptional Interference Promoting HIV Latency. *J Virol* 85, 3187-3202.
  88. Garaigorta, U., Falcon, A.M., Ortín, J., 2005. Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *J Virol* 79, 15246-15257.
  89. Garaigorta, U., Ortín, J., 2007. Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic acids research* 35, 4573-4582.
  90. Garcia-Robles, I., Akarsu, H., Müller, C.W., Ruigrok, R.W., Baudin, F., 2005. Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology* 332, 329-336.
  91. Garfinkel, M.S., Katze, M.G., 1992. Translational control by influenza virus. Selective and cap-dependent translation of viral mRNAs in infected cells. *The Journal of biological chemistry* 267, 9383-9390.
  92. Garfinkel, M.S., Katze, M.G., 1993. Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *The Journal of biological chemistry* 268, 22223-22226.

93. Gastaminza, P., Perales, B., Falcón, A.M., Ortín, J., 2003. Mutations in the N-terminal region of influenza virus PB2 protein affect virus RNA replication but not transcription. *Journal of Virology* 77, 5098-5108.
94. Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P., 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-1423.
95. Gibbs, J.S., Malide, D., Hornung, F., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2003. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol* 77, 7214-7224.
96. Gomez-Puertas, P., Albo, C., Perez-Pastrana, E., Vivo, A., Portela, A., 2000. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* 74, 11538-11547.
97. Gomez-Puertas, P., Mena, I., Castillo, M., Vivo, A., Perez-Pastrana, E., Portela, A., 1999. Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *The Journal of general virology* 80 ( Pt 7), 1635-1645.
98. González, S., Zurcher, T., Ortín, J., 1996. Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: a model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic acids research* 24, 4456-4463.
99. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36, 59-74.
100. Graham, F.L., van der Eb, A.J., 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
101. Grewal, S.I., Jia, S., 2007. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8, 35-46.
102. Guilligay, D., Tarendeau, F., Resa-Infante, P., Coloma, R., Crepin, T., Sehr, P., Lewis, J., Ruigrok, R.W., Ortín, J., Hart, D.J., Cusack, S., 2008. The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nature structural & molecular biology* 15, 500-506.
103. Guldner, H.H., Szosteki, C., Grotzinger, T., Will, H., 1992. IFN enhance expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 149, 4067-4073.
104. Hagen, M., Chung, T.D., Butcher, J.A., Krystal, M., 1994. Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral end for endonuclease activity. *Journal of Virology* 68, 1509-1515.
105. Hale, B.G., Randall, R.E., Ortín, J., Jackson, D., 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *The Journal of general virology* 89, 2359-2376.
106. Han, M., Grunstein, M., 1988. Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell* 55, 1137-1145.
107. Hara, K., Shiota, M., Kido, H., Ohtsu Y, Kashiwagi, T., Iwahashi, J., Hamada, N., Mizoue, K., Tsumura, N., Kato, H., Toyoda, T., 2001. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes Cells* 6, 87-97.
108. Hatada, E., Saito, S., Okishio, N., Fukuda, R., 1997. Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. *Journal of General Virology* 78, 1059-1063.
109. Hatada, E., Takizawa, T., Fukuda, R., 1992. Specific binding of influenza virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro. *Journal of General Virology* 73, 17-25.
110. Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., Kawaoka, Y., 2001. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293, 1840-1842.
111. Hay, A.J., Lomniczi, B., Bellamy, A.R., Skehel, J.J., 1977. Transcription of the influenza virus genome. *Virology* 83, 337-355.
112. Hay, A.J., Skehel, J.J., McCauley, J., 1982. Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology* 116, 517-522.



113. Helenius, A., 1992. Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* 69, 577-578.
114. Hemerka, J.N., Wang, D., Weng, Y., Lu, W., Kaushik, R.S., Jin, J., Harmon, A.F., Li, F., 2009. Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay. *J Virol* 83, 3944-3955.
115. Herrera, F.J., Triezenberg, S.J., 2004. VP16-dependent association of chromatin-modifying coactivators and underrepresentation of histones at immediate-early gene promoters during herpes simplex virus infection. *J Virol* 78, 9689-9696.
116. Herz, C., Stavnezer, E., Krug, R., Gurney, T., 1981. Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells. *Cell* 26, 391-400.
117. Hirayama, E., Atagi, H., Hiraki, A., Kim, J., 2004. Heat shock protein 70 is related to thermal inhibition of nuclear export of the influenza virus ribonucleoprotein complex. *J Virol* 78, 1263-1270.
118. Holsinger, L.J., Lamb, R.A., 1991. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* 183, 32-43.
119. Honda, A., Okamoto, T., Ishihama, A., 2007. Host factor Ebp1: selective inhibitor of influenza virus transcriptase. *Genes Cells* 12, 133-142.
120. Honda, A., Ueda, K., Nagata, K., Ishihama, A., 1988. RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *Journal of Biochemistry Tokyo* 104, 1021-1026.
121. Horne, R.W., Waterson, A.P., Wildy, P., Farnham, A.E., 1960. The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies of the structure of myxovirus particles by negative staining techniques. *Virology* 11, 79-98.
122. Horwitz, G.A., Zhang, K., McBrien, M.A., Grunstein, M., Kurdistani, S.K., Berk, A.J., 2008. Adenovirus small e1a alters global patterns of histone modification. *Science (New York, N.Y)* 321, 1084-1085.
123. Hoyle, L., Horne, R.W., Waterson, A.P., 1961. The structure and composition of the myxoviruses. II. Components released from the influenza virus particle by ether. *Virology* 13, 448-459.
124. Hsu, M.T., Parvin, J.D., Gupta, S., Krystal, M., Palese, P., 1987. Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 8140-8144.
125. Huang, T.S., Palese, P., Krystal, M., 1990. Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol* 64, 5669-5673.
126. Huarte, M., Falcon, A., Nakaya, Y., Ortin, J., Garcia-Sastre, A., Nieto, A., 2003. Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J Virol* 77, 6007-6013.
127. Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J.J., Roncal, F., Ortin, J., Nieto, A., 2001. PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol* 75, 8597-8604.
128. Huet, S., Avilov, S.V., Ferbitz, L., Daigle, N., Cusack, S., Ellenberg, J., 2010. Nuclear import and assembly of influenza A virus RNA polymerase studied in live cells by fluorescence cross-correlation spectroscopy. *J Virol* 84, 1254-1264.
129. Ilves, I., Maemets, K., Silla, T., Janikson, K., Ustav, M., 2006. Brd4 is involved in multiple processes of the bovine papillomavirus type 1 life cycle. *J Virol* 80, 3660-3665.
130. Inglis, S.C., Barret, T., Brown, C.M., Almond, J.W., 1979. The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 76, 3790-3794.
131. Inglis, S.C., Brown, C.M., 1981. Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acid Res.* 9, 2727-2740.
132. Inglis, S.C., Carroll, A.R., Lamb, R.A., Mahy, B.W.J., 1976. Polypeptides specified by the influenza virus genome. I. Evidence for eight

distinct gene products specified by fowl plague virus. 74, 489-503.

133. Itoh, Y., Shinya, K., Kiso, M., Watanabe, T., Sakoda, Y., Hatta, M., Muramoto, Y., Tamura, D., Sakai-Tagawa, Y., Noda, T., Sakabe, S., Imai, M., Hatta, Y., Watanabe, S., Li, C., Yamada, S., Fujii, K., Murakami, S., Imai, H., Kakugawa, S., Ito, M., Takano, R., Iwatsuki-Horimoto, K., Shimojima, M., Horimoto, T., Goto, H., Takahashi, K., Makino, A., Ishigaki, H., Nakayama, M., Okamatsu, M., Warshauer, D., Shult, P.A., Saito, R., Suzuki, H., Furuta, Y., Yamashita, M., Mitamura, K., Nakano, K., Nakamura, M., Brockman-Schneider, R., Mitamura, H., Yamazaki, M., Sugaya, N., Suresh, M., Ozawa, M., Neumann, G., Gern, J., Kida, H., Ogasawara, K., Kawaoka, Y., 2009. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460, 1021-1025.
134. Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Noda, T., Kiso, M., Maeda, J., Watanabe, S., Muramoto, Y., Fujii, K., Kawaoka, Y., 2006. The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* 80, 5233-5240.
135. Jackson, D., Caton, A.J., McCready, S.J., Cook, P.R., 1982. influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. *Nature* 296, 366-368.
136. Jayani, RS, Ramanujam, PL, Galande, S 2010. Studying histone modifications and their genomic functions by employing chromatin immunoprecipitation and immunoblotting. *Methods Cell Biol* 98, 35-56.
137. Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science (New York, N.Y)* 293, 1074-1080.
138. Jones, I.M., Reay, P.A., Philpott, K.L., 1986. Nuclear location of all three influenza polymerase proteins and a nuclear signal in polymerase PB2. *The EMBO journal* 5, 2371-2376.
139. Jorba, N., 2009. Complejos intracelulares formados por la RNA polimerasa del virus de la gripe: oligomerización, factores asociados y complementación génica., Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid., Madrid.
140. Jorba, N., Coloma, R., Ortin, J., 2009. Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog* 5, e1000462.
141. Jorba, N., Juarez, S., Torreira, E., Gastaminza, P., Zamarreno, N., Albar, J.P., Ortin, J., 2008. Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* 8, 2077-2088.
142. Josset, L., Frobert, E., Rosa-Calatrava, M., 2008. Influenza A replication and host nuclear compartments: many changes and many questions. *J Clin Virol* 43, 381-390.
143. Kakugawa, S., Shimojima, M., Neumann, G., Goto, H., Kawaoka, Y., 2009. RuvB-like protein 2 is a suppressor of influenza A virus polymerases. *J Virol* 83, 6429-6434.
144. Kalpana, G.V., Marmon, S., Wang, W., Crabtree, G.R., Goff, S.P., 1994. Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science (New York, N.Y)* 266, 2002-2006.
145. Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K.P., Artarini, A., Heuer, D., Becker, D., Khalil, H., Ogilvie, L.A., Hess, S., Maurer, A.P., Muller, E., Wolff, T., Rudel, T., Meyer, T.F., 2010. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463, 818-822.
146. Katze, M.G., Krug, R.M., 1990. Translational control in influenza virus-infected cells. *Enzyme* 44, 265-277.
147. Kawaguchi A, and Nagata K. 2007. De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. *The EMBO journal* 26: 4566-4575.
148. Kayne, P.S., Kim, U.J., Han, M., Mullen, J.R., Yoshizaki, F., Grunstein, M., 1988. Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* 55, 27-39.

149. Kingsbury, D.W., Jones, I.M., Murti, K.G., 1987. Assembly of influenza ribonucleoprotein in vitro using recombinant nucleoprotein. 156, 396-403.
150. Klose, R.J., Kallin, E.M., Zhang, Y., 2006. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* 7, 715-727.
151. Klumpp, K., Ford, M.J., Ruigrok, R.W., 1998. Variation in ATP requirement during influenza virus transcription. *The Journal of general virology* 79 ( Pt 5), 1033-1045.
152. Klumpp, K., Ruigrok, R.W., Baudin, F., 1997. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *The EMBO journal* 16, 1248-1257.
153. Knezetic, J.A., Luse, D.S., 1986. The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro. *Cell* 45, 95-104.
154. Knipe, D.M., Cliffe, A., 2008. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol* 6, 211-221.
155. Konig, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H.H., Bhattacharyya, S., Alamares, J.G., Tscherne, D.M., Ortigoza, M.B., Liang, Y., Gao, Q., Andrews, S.E., Bandyopadhyay, S., De Jesus, P., Tu, B.P., Pache, L., Shih, C., Orth, A., Bonamy, G., Miraglia, L., Ideker, T., Garcia-Sastre, A., Young, J.A., Palese, P., Shaw, M.L., Chanda, S.K., 2010. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463, 813-817.
156. Kornberg, R.D., Thomas, J.O., 1974. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science (New York, N.Y)* 184, 865-868.
157. Krug, R.M., Alonso-Kaplen, F.V., Julkunen, I., Katze, M.G., 1989. Expression and replication of the influenza virus genome., in: R.M. Krug (Ed.), *The influenza viruses*. Plenum Press, New York, 89-152.
158. Krug, R.M., Broni, B.A., Bouloy, M., 1979. Are the 5'-ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell* 18, 329-334.
159. Kwon, S.H., Workman, J.L., 2008. The heterochromatin protein 1 (HP1) family: put away a bias toward HP1. *Mol Cells* 26, 217-227.
160. Lamb, R.A., Choppin, P.W., 1979. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 76, 4908-4912.
161. Lamb, R.A., Choppin, P.W., 1983. The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 52, 467-506.
162. Lamb, R.A., Choppin, P.W., Chanock, R.M., Lai, C.J., 1980. Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 1857-1861.
163. Lamb, R.A., Lai, C.J., 1980. Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* 21, 475-485.
164. Lamb, R.A., Lai, C.J., Choppin, P.W., 1981. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 78, 4170-4174.
165. Langmore, J.P., Schutt, C., 1980. The higher order structure of chicken erythrocyte chromosomes in vivo. *Nature* 288, 620-622.
166. Lathrop, M.J., Chakrabarti, L., Eng, J., Rhodes, C.H., Lutz, T., Nieto, A., Liggitt, H.D., Warner, S., Fields, J., Stoger, R., Fiering, S., 2010. Deletion of the Chd6 exon 12 affects motor coordination. *Mamm Genome* 21, 130-142.
167. Laurent, B.C., Treitel, M.A., Carlson, M., 1991. Functional interdependence of the yeast SNF2, SNF5, and SNF6 proteins in transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 2687-2691.
168. Lee, D.H., Goldberg, A.L., 1996. Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in

*Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of biological chemistry 271, 27280-27284.

169. Lesbats, P., Botbol, Y., Chevereau, G., Vaillant, C., Calmels, C., Arneodo, A., Andreola, M.L., Lavigne, M., Parissi, V., 2011. Functional coupling between HIV-1 integrase and the SWI/SNF chromatin remodeling complex for efficient in vitro integration into stable nucleosomes. *PLoS Pathog* 7, e1001280.
170. Li, B., Carey, M., Workman, L., 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707-719.
171. Li, G., Zhang, J., Tong, X., Liu, W., Ye, X., 2011. Heat shock protein 70 inhibits the activity of influenza A virus ribonucleoprotein and blocks the replication of virus in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 6, e16546.
172. Liang, Y., Hong, Y., Parslow, T.G., 2005. cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol* 79, 10348-10355.
173. Liang, Y., Huang, T., Ly, H., Parslow, T.G., 2008. Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments. *J Virol* 82, 229-236.
174. Liang, Y., Vogel, J.L., Narayanan, A., Peng, H., Kristie, T.M., 2009. Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks alpha-herpesvirus lytic replication and reactivation from latency. *Nature medicine* 15, 1312-1317.
175. Lieberman, P.M., 2006. chromatin regulation of virus infection. *Trends Microbiol* 14, 132-140.
176. Lieberman, P.M., 2008. Chromatin organization and virus gene expression. *J Cell Physiol* 216, 295-302.
177. Liu, C., Eichelberger, M.C., Compans, R.W., Air, G.M., 1995. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol* 69, 1099-1106.
178. Liu, C.L., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Schreiber, S.L., Friedman, N., Rando, O.J., 2005. Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol* 3, e328.
179. Lopez-Turiso, J.A., Martinez, C., Tanaka, T., Ortin, J., 1990. The synthesis of influenza virus negative-strand RNA takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction. *Virus research* 16, 325-337.
180. Lorch, Y., LaPointe, J.W., Kornberg, R.D., 1987. Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49, 203-210.
181. Loucaides, E.M., von Kirchbach, J.C., Foeglein, A., Sharps, J., Fodor, E., Digard, P., 2009. Nuclear dynamics of influenza A virus ribonucleoproteins revealed by live-cell imaging studies. *Virology* 394, 154-163.
182. Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
183. Lutz, T., Stoger, R., Nieto, A., 2006a. CHD6 is a DNA-dependent ATPase and localizes at nuclear sites of mRNA synthesis. *FEBS Lett* 580, 5851-5857.
184. Ma, K., Roy, A.M., Whittaker, G.R., 2001. Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. *Virology* 282, 215-220.
185. Maassab, H.F., 1967. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees c. *Nature* 213, 612-4.
186. Madin, S.H., Darby, N.B., Jr., 1958. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med* 98, 574-576.
187. Mahy, B.W.J., 1983. Mutants of influenza viruses, in: P. Palese, D.W. Kingsbury (Eds.), *Genetics of influenza viruses*. Springer-Verlag, Vienna, Austria.
188. Marión, R.M., Zurcher, T., de, I.L.S., Ortin, J., 1997. Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *Journal of General Virology* 78, 2447-2451.
189. Marom, R., Shur, L., Hager, G.L., Benayahu, D., 2006. Expression and regulation of



- CReMM, a chromodomain helicase-DNA binding (CHD), in marrow stroma derived osteoprogenitors. *J Cell Physiol.* 207, 628-635.
190. Martín-Benito, J., Area, E., Ortega, J., Llorca, O., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L., Ortín, J., 2001. Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO reports* 2, 313-317.
  191. Martin, K., Helenius, A., 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* 67, 117-130.
  192. Maruyama, A., Nishikawa, K., Kawatani, Y., Mimura, J., Hosoya, T., Harada, N., Yamamoto, M., Itoh, K., 2011. The novel NRF2-interacting factor KAP1 regulates susceptibility to oxidative stress by promoting the NRF2-mediated cytoprotective response. *Biochem J.*
  193. Maurer-Stroh, S., Dickens, N.J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F., Ponting, C.P., 2003. The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci* 28, 69-74.
  194. Mayer, D., Molawi, K., Martinez-Sobrido, L., Ghanem, A., Thomas, S., Baginsky, S., Grossmann, J., Garcia-Sastre, A., Schwemmle, M., 2007. Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches. *Journal of proteome research* 6, 672-682.
  195. Mazur, I., Anhlán, D., Mitzner, D., Wixler, L., Schubert, U., Ludwig, S., 2008. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cellular microbiology* 10, 1140-1152.
  196. McBride, A.A., McPhillips, M.G., Oliveira, J.G., 2004. Brd4: tethering, segregation and beyond. *Trends Microbiol* 12, 527-529.
  197. McCown, M.F., Pekosz, A., 2006. Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J Virol* 80, 8178-8189.
  198. McLaughlin-Drubin, M.E., Crum, C.P., Munger, K., 2011. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 2130-2135.
  199. Medcalf, L., Poole, E., Elton, D., Digard, P., 1999. Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein. *Journal of Virology* 73, 7349-7356.
  200. Mena, I., de la Luna, S., Albo, C., Martín, J., Nieto, A., Ortín, J., Portela, A., 1994. Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia-T7 RNA polymerase expression system. *Journal of General Virology* 75, 2109-2114.
  201. Minarovits, J., 2009. Microbe-induced epigenetic alterations in host cells: the coming era of patho-epigenetics of microbial infections. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 56, 1-19.
  202. Mok, H.P., Lever, A.M., 2007. Chromatin, gene silencing and HIV latency. *Genome Biol* 8, 228.
  203. Momose, F., Basler, C.F., O'Neill, R.E., Iwamatsu, A., Palese, P., Nagata, K., 2001. Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* 75, 1899-1908.
  204. Momose, F., Handa, H., Nagata, K., 1996. Identification of host factors that regulate the influenza virus RNA polymerase activity. *Biochimie* 78, 1103-1108.
  205. Momose, F., Naito, T., Yano, K., Sugimoto, S., Morikawa, Y., Nagata, K., 2002. Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *The Journal of biological chemistry* 277, 45306-45314.
  206. Mukaigawa, J., Nayak, D.P., 1991. Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol* 65, 245-253.

207. Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Horimoto, T., Kida, H., Kawaoka, Y., 2006. Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol* 80, 2318-2325.
208. Naito, T., Momose, F., Kawaguchi, A., Nagata, K., 2007. Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol* 81, 1339-1349.
209. Nath, S.T., Nayak, D.P., 1990. Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1). *Molecular and cellular biology* 10, 4139-4145.
210. Nayak, D.P., Balogun, R.A., Yamada, H., Zhou, Z.H., Barman, S., 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus research* 143, 147-161.
211. Nayak, D.P., Hui, E.K., Barman, S., 2004. Assembly and budding of influenza virus. *Virus research* 106, 147-165.
212. Neumann, G., Brownlee, G.G., Fodor, E., Kawaoka, Y., 2004. Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 283, 121-143.
213. Neumann, G., Noda, T., Kawaoka, Y., 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459, 931-939.
214. Nieto, A., de la Luna, S., Barcena, J., Portela, A., Ortin, J., 1994. Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. *The Journal of general virology* 75 ( Pt 1), 29-36.
215. Nioi, P., Nguyen, T., Sherratt, P.J., Pickett, C.B., 2005. The Carboxi-Terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* 25, 10895-10906.
216. Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C.D., Tempst, P., Reinberg, D., 2002. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev* 16, 479-489.
217. Nishiyama, M., Oshikawa, K., Tsukada, Y., Nakagawa, T., Iemura, S., Natsume, T., Fan, Y., Kikuchi, A., Skoultschi, A.I., Nakayama, K.I., 2009. CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nat Cell Biol* 11, 172-182.
218. Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R.H., Kawaoka, Y., 2006. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* 439, 490-492.
219. Noton, S.L., Medcalf, E., Fisher, D., Mullin, A.E., Elton, D., Digard, P., 2007. Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *The Journal of general virology* 88, 2280-2290.
220. O'Connell, B.C., Harper, J.W., 2007. Ubiquitin proteasome system (UPS): what can chromatin do for you? *Curr Opin Cell Biol* 19, 206-214.
221. O'Neill, R.E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P., Moroianu, J., 1995. Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *The Journal of biological chemistry* 270, 22701-22704.
222. O'Neill, R.E., Talon, J., Palese, P., 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO journal* 17, 288-296.
223. Obayashi, E., Yoshida, H., Kawai, F., Shibayama, N., Kawaguchi, A., Nagata, K., Tame, J.R., Park, S.Y., 2008. The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* 454, 1127-1131.
224. Ochoa, M., Bárcena, J., de la Luna, S., Melero, J.A., Douglas, A.R., Nieto, A., Ortin, J., Skehel, J.J. and Portela, A., 1995. Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus research* 37, 305-315.



225. Ortega, J., Martin-Benito, J., Zurcher, T., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L., Ortin, J., 2000. Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* 74, 156-163.
226. Ozawa, M., Maeda, J., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Goto, H., Horimoto, T., Kawaoka, Y., 2009. Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *J Virol* 83, 3384-3388.
227. Palese, P., Compans, R.W., 1976. Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *The Journal of general virology* 33, 159-163.
228. Palese, P., Schulman, J., 1974. Isolation and characterization of influenza virus recombinants with high and low neuraminidase activity. Use of 2-(3'-methoxyphenyl)-n-acetylneuraminic acid to identify cloned populations. *Virology* 57, 227-237.
229. Paro, R., Hogness, D.S., 1991. The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 263-267.
230. Patel, D., Huang, S.M., Baglia, L.A., McCance, D.J., 1999. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *The EMBO journal* 18, 5061-5072.
231. Payne, C., Braun, R.E., 2006. Histone lysine trimethylation exhibits a distinct perinuclear distribution in Plzf-expressing spermatogonia. *Dev Biol* 293, 461-472.
232. Peng, J.C., Karpen, G.H., 2008. Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. *Curr Opin Genet Dev* 18, 204-211.
233. Peng, Y.C., Breiding, D.E., Sverdrup, F., Richard, J., Androphy, E.J., 2000. AMF-1/Gps2 binds p300 and enhances its interaction with papillomavirus E2 proteins. *J Virol* 74, 5872-5879.
234. Perales, B., Ortin, J., 1997. The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA. *J Virol* 71, 1381-1385.
235. Perales, B., Sanz-Ezquerro, J.J., Gastaminza, P., Ortega, J., Fernandez-Santarén, J., Ortín, J., Nieto, A., 2000. The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *Journal of Virology* 74, 1307-1312.
236. Pérez-González, A., 2007. Participación de la proteína hCLE en la expresión génica celular. Implicaciones en la infección por el virus de la gripe., Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
237. Pérez-González, A., Rodriguez, A., Huarte, M., Salanueva, I.J., Nieto, A., 2006. hCLE/CGI-99, a human protein that interacts with the influenza virus polymerase, is a mRNA transcription modulator. *J Mol Biol* 362, 887-900.
238. Perez, D.R., Donis, R.O., 1995. A 48-amino-acid region of influenza A virus PB1 protein is sufficient for complex formation with PA. *J Virol* 69, 6932-6939.
239. Peterson, C.L., Herskowitz, I., 1992. Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* 68, 573-583.
240. Pinto, L.H., Holsinger, L.J., Lamb, R.A., 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69, 517-528.
241. Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., de la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B., Zhang, Y., 2003. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science (New York, N.Y)* 300, 131-135.
242. Plotch, S.J., Bouloy, M., Ulmanen, I., Krug, R.M., 1981. A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* 23, 847-858.
243. Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., Tordo, N., 1990. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent

polymerases encoding elements. *EMBO Journal* 8, 3867-3874.

244. Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolzheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D.K., Young, R.A., 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122, 517-527.
245. Poole, E., Elton, D., Medcalf, L., Digard, P., 2004. Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* 321, 120-133.
246. Poon, L.L., Fodor, E., Brownlee, G.G., 2000. Polyuridylated mRNA synthesized by a recombinant influenza virus is defective in nuclear export. *J Virol* 74, 418-427.
247. Poon, L.L., Pritlove, D.C., Fodor, E., Brownlee, G.G., 1999. Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol* 73, 3473-3476.
248. Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates, J.R., 3rd, Grant, P.A., 2005. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 433, 434-438.
249. Qiu, J., 2006. Epigenetics: unfinished symphony. *Nature* 441, 143-145.
250. Qiu, Y., Nemeroff, M., Krug, R.M., 1995. The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *RNA* 1, 304-316.
251. Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., Jenuwein, T., 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-599.
252. Resa-Infante, P., Jorba, N., Zamarreno, N., Fernandez, Y., Juarez, S., Ortin, J., 2008. The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PLoS ONE* 3, e3904.
253. Resa-Infante, P., Recuero-Checa, M.A., Zamarreno, N., Llorca, O., Ortin, J., 2010. Structural and functional characterization of an influenza virus RNA polymerase-genomic RNA complex. *J Virol* 84, 10477-10487.
254. Richardson, J.C., Akkina, R.K., 1991. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Archives of virology* 116, 69-80.
255. Rieder, M., Conzelmann, K.K., 2009. Rhabdovirus evasion of the interferon system. *J Interferon Cytokine Res* 29, 499-509.
256. Robb, N.C., Smith, M., Vreede, F.T., Fodor, E., 2009. The NS2/NEP Protein Regulates Transcription and Replication of the Influenza Virus RNA Genome. *The Journal of general virology*.
257. Robertson, J.S., 1979. 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic acids research* 6, 3745-3757.
258. Rodriguez-Paredes, M., Ceballos-Chavez, M., Esteller, M., Garcia-Dominguez, M., Reyes, J.C., 2009. The chromatin remodeling factor CHD8 interacts with elongating RNA polymerase II and controls expression of the cyclin E2 gene. *Nucleic acids research* 37, 2449-2460.
259. Rodriguez, A., 2009. Acoplamiento funcional entre el virus de la gripe y la maquinaria de transcripción celular. Relación con la patogenicidad viral., Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Molecular., Madrid.
260. Rodriguez, A., Perez-Gonzalez, A., Hossain, M.J., Chen, L.M., Rolling, T., Perez-Brena, P., Donis, R., Kochs, G., Nieto, A., 2009. Attenuated strains of influenza A viruses do not induce degradation of RNA polymerase II. *J Virol* 83, 11166-11174.
261. Rodriguez, A., Perez-Gonzalez, A., Nieto, A., 2007. Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II. *J Virol* 81, 5315-5324.
262. Rossman, J.S., Jing, X., Leser, G.P., Lamb, R.A., 2010. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell* 142, 902-913.

263. Rott, R., Scholtissek, C., 1970. Specific inhibition of influenza replication by alpha-amanitin. *Nature* 228, 56.
264. Sanz-Ezquerro, J.J., de la Luna, S., Ortín, J., Nieto, A., 1995. Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *Journal of Virology* 69, 2420-2426.
265. Sanz-Ezquerro, J.J., Fernández-Santarén, J., Sierra, T., Aragón, T., Ortega, J., Ortín, J., Smith, G.L., Nieto, A., 1998. The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. *Journal of General Virology* 79, 471-478.
266. Sanz-Ezquerro, J.J., Zurcher, T., de la Luna, S., Ortín, J., Nieto, A., 1996. The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. *Journal of Virology* 70, 1905-1911.
267. Sato, Y., Yoshioka, K., Suzuki, C., Awashima, S., Hosaka, Y., Yewdell, J., Kuroda, K., 2003. Localization of influenza virus proteins to nuclear dot 10 structures in influenza virus-infected cells. *Virology* 310, 29-40.
268. Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T., Simons, K., 1999. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 274, 2038-2044.
269. Schnell, J.R., Chou, J.J., 2008. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza. *Nature* 451, 591-595.
270. Schnetz, M.P., Bartels, C.F., Shastri, K., Balasubramanian, D., Zentner, G.E., Balaji, R., Zhang, X., Song, L., Wang, Z., Laframboise, T., Crawford, G.E., Scacheri, P.C., 2009. Genomic distribution of CHD7 on chromatin tracks H3K4 methylation patterns. *Genome Res* 19, 590-601.
271. Scholtissek, C., Becht, H., 1971. Binding of ribonucleic acids to the RNP-antigen protein of influenza viruses. *The Journal of general virology* 10, 11-16.
272. Schones, D.E., Zhao, K., 2008. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nat Rev Genet* 9, 179-191.
273. Schroth, G.P., Yau, P., Imai, B.S., Gatewood, J.M., Bradbury, E.M., 1990. A NMR study of mobility in the histone octamer. *FEBS Lett* 268, 117-120.
274. Schweiger, M.R., You, J., Howley, P.M., 2006. Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol* 80, 4276-4285.
275. Sehgal, P.B., Derman, E., Molloy, G.R., Tamm, I., Darnell, J.E., 1976. 5,6-Dichloro-1-Beta-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits initiation of nuclear heterogeneous RNA chains in HeLa cells. *Science (New York, N.Y)* 194, 431-433.
276. Shapira, S.D., Gat-Viks, I., Shum, B.O., Dricot, A., de Grace, M.M., Wu, L., Gupta, P.B., Hao, T., Silver, S.J., Root, D.E., Hill, D.E., Regev, A., Hacohen, N., 2009. A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection. *Cell* 139, 1255-1267.
277. Shapiro, G.I., Gurney, T.J., Krug, R.M., 1987. Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol* 61, 764-773.
278. Shapiro, G.I., Krug, R.M., 1988. Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol* 62, 2285-2290.
279. Shi, L., Galarza, J.M., Summers, D.F., 1996. Recombinant-baculovirus-expressed PB2 subunit of the influenza A virus RNA polymerase binds cap groups as an isolated subunit. *Virus research* 42: 1-9.
280. Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
281. Shilatifard, A., 2006. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 75, 243-269.
282. Shimizu, K., Handa, H., Nakada, S., Nagata, K., 1994. Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral factors. *Nucleic acids research* 22, 5047-

5053.

283. Shur, I., Benayahu, D., 2005. Characterization and functional analysis of CReMM, a novel chromodomain helicase DNA-binding protein. *J Mol Biol* 352, 646-655.
284. Simpson-Holley, M., Ellis, D., Fisher, D., Elton, D., McCauley, J., Digard, P., 2002. A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions. *Virology* 301, 212-225.
285. Sims, R.J., 3rd, Chen, C.F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S.S., Reinberg, D., 2005. Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *The Journal of biological chemistry* 280, 41789-41792.
286. Sims, R.J., 3rd, Millhouse, S., Chen, C.F., Lewis, B.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J.L., Reinberg, D., 2007. Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 28, 665-676.
287. Skehel, J.J., Bizebard, T., Bullough, P.A., Hughson, F.M., Knossow, M., Steinhauer, D.A., Wharton, S.A., Wiley, D.C., 1995. Membrane fusion by influenza hemagglutinin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, 573-580.
288. Skehel, J.J., Wiley, D.C., 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69, 531-569.
289. Smith, G.L., Levin, J.Z., Palese, P., Moss, B., 1987. Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses. *Virology* 160, 336-345.
290. Soria, C., Estermann, F.E., Espantman, K.C., O'Shea, C.C., 2010. Heterochromatin silencing of p53 target genes by a small viral protein. *Nature* 466, 1076-1081.
291. Srinivasan, S., Armstrong, J.A., Deuring, R., Dahlsveen, I.K., McNeill, H., Tamkun, J.W., 2005. The *Drosophila* trithorax group protein Kismet facilitates an early step in transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Development* 132, 1632-1635.
292. Srinivasan, S., Dorigi, K.M., Tamkun, J.W., 2008. *Drosophila* Kismet regulates histone H3 lysine 27 methylation and early elongation by RNA polymerase II. *PLoS Genet* 4, e1000217.
293. Stegmann, T., Morselt, H.W., Booy, F.P., van Breemen, J.F., Scherphof, G., Wilschut, J., 1987. Functional reconstitution of influenza virus envelopes. *The EMBO journal* 6, 2651-2659.
294. Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
295. Sugiyama, K., Obayashi, E., Kawaguchi, A., Suzuki, Y., Tame, J.R., Nagata, K., Park, S.Y., 2009. Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *The EMBO journal* 28, 1803-1811.
296. Sui, B., Bamba, D., Weng, K., Ung, H., Chang, S., Van Dyke, J., Goldblatt, M., Duan, R., Kinch, M.S., Li, W.B., 2009. The use of Random Homozygous Gene Perturbation to identify novel host-oriented targets for influenza. *Virology* 387, 473-481.
297. Surapureddi, S., Viswakarma, N., Yu, S., Guo, D., Rao, M.S., Reddy, J.K., 2006. PRIC320, a transcription coactivator, isolated from peroxisome proliferator-binding protein complex. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 535-543.
298. Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Kobayashi, S., Igarashi, M., Youn, M.Y., Takeyama, K., Nakamura, T., Mezaki, Y., Takezawa, S., Yogiashi, Y., Kitagawa, H., Yamada, G., Takada, S., Minami, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Kato, S., 2007. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol* 9, 1273-1285.
299. Takizawa, N., Watanabe, K., Nouno, K., Kobayashi, N., Nagata, K., 2006. Association of functional influenza viral proteins and RNAs with nuclear chromatin and sub.chromatin structure. *Microbes and Infection* 8, 823-833.



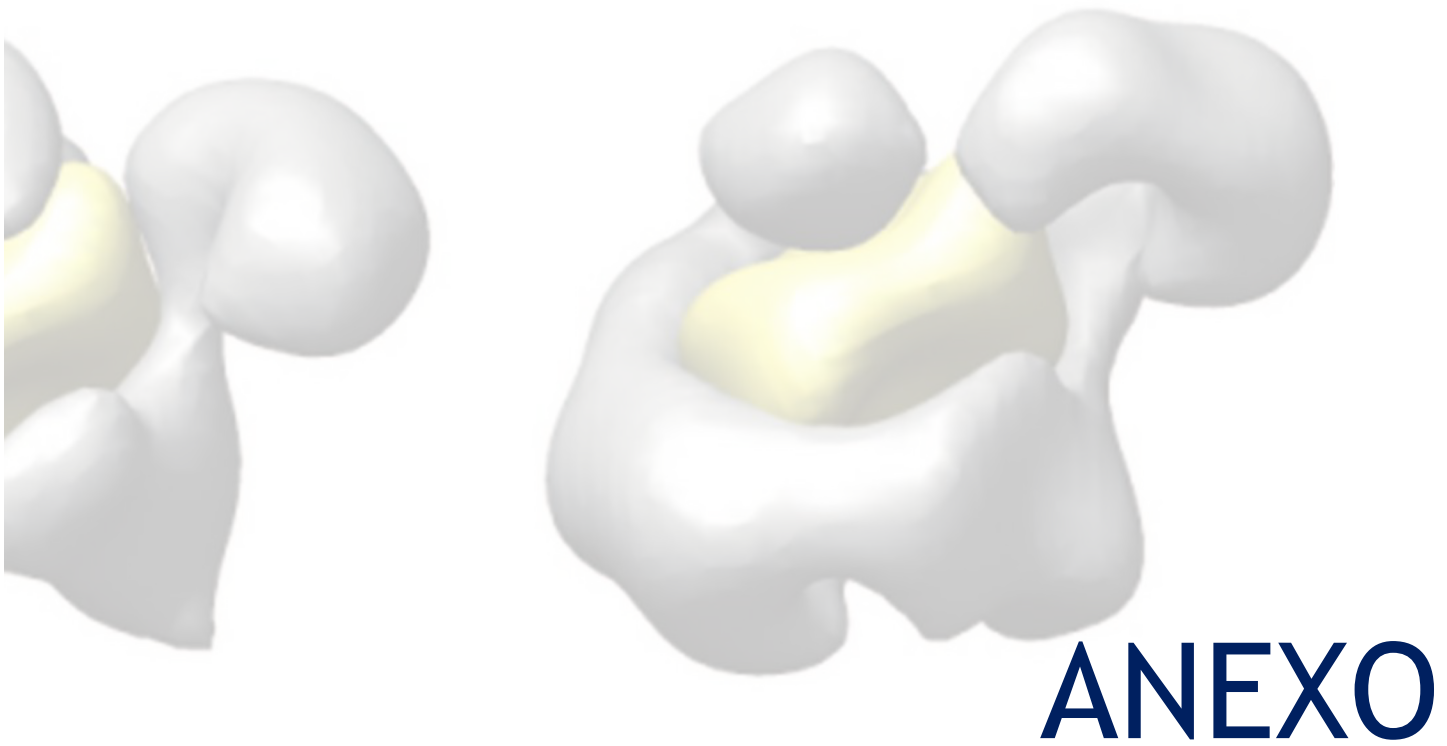
300. Tamm, I., Folkers, K., Shunk, C.H., Horsfall, F.L., Jr., 1954. Inhibition of influenza virus multiplication by N-glycosides of benzimidazoles-N. *J Exp Med* 99, 227-250.
301. Thomas, D., Blakqori, G., Wagner, V., Banholzer, M., Kessler, N., Elliott, R.M., Haller, O., Weber, F., 2004. Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *The Journal of biological chemistry* 279, 31471-31477.
302. Thompson, B.A., Tremblay, V., Lin, G., Bochar, D.A., 2008. CHD8 is an ATP-dependent chromatin remodeling factor that regulates beta-catenin target genes *Molecular and cellular biology*.
303. Tong, J.K., Hassig, C.A., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E., Schreiber, S.L., 1998. Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature* 395, 917-921.
304. Torreira, E., Schoehn, G., Fernandez, Y., Jorba, N., Ruigrok, R.W., Cusack, S., Ortin, J., Llorca, O., 2007. Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic acids research* 35, 3774-3783.
305. Toyoda, T., Adyshev, D.M., Kobayashi, M., Iwata, A., Ishihama, A., 1996. Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites. *The Journal of general virology* 77 ( Pt 9), 2149-2157.
306. Ulmanen, I., Broni, B.A., Krug, R.M., 1981. Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 78, 7355-7359.
307. Vanti, M., Gallastegui, E., Respaldiza, I., Rodriguez-Gil, A., Gomez-Herreros, F., Jimeno-Gonzalez, S., Jordan, A., Chavez, S., 2009. Yeast genetic analysis reveals the involvement of chromatin reassembly factors in repressing HIV-1 basal transcription. *PLoS Genet* 5, e1000339.
308. Verbruggen, P., Ruf, M., Blakqori, G., Overby, A.K., Heidemann, M., Eick, D., Weber, F., 2011. Interferon antagonist NSs of La Crosse virus triggers a DNA damage response-like degradation of transcribing RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry* 286, 3681-3692.
309. Vissers, L.E., vanRavenswaaij, C.M., Admiraal, R., Hurst, J.A., deVries, B.B., Janssen, I.M., vanderVliet, W.A., Huys, E.H., deJong, P.J., Hamel, B.C., Schoenmakers, E.F., Brunner, H.G., Veltman, J.A., vanKessel, A.G., 2004. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet* 36, 955-957.
310. Vogel, U., Scholtissek, C., 1995. Inhibition of the intracellular transport of influenza viral RNA by actinomycin D. *Archives of virology* 140, 1715-1723.
311. Vreede, F.T., Chan, A.Y., Sharps, J., Fodor, E., 2010. Mechanisms and functional implications of the degradation of host RNA polymerase II in influenza virus infected cells. *Virology* 396, 125-134.
312. Vreede, F.T., Fodor, E., 2010. The role of the influenza virus RNA polymerase in host shut-off. *Virulence* 1, 436-439.
313. Vreede, F.T., Gifford, H., Brownlee, G.G., 2008. Role of initiating nucleoside triphosphate concentrations in the regulation of influenza virus replication and transcription. *J Virol* 82, 6902-6910.
314. Vreede, F.T., Jung, T.E., Brownlee, G.G., 2004. Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol* 78, 9568-9572.
315. Wang, H., Long, X.H., Sun, Z.Z., Rigaud, O., Xu, Q.Z., Huang, Y.C., Sui, J.L., Bai, B., Zhou, P.K., 2006. Identification of differentially transcribed genes in human lymphoblastoid cells irradiated with 0.5 Gy of g - ray and the involvement of low dose radiation inducible CHD6 gene in cell proliferation and radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Biol.* 82, 181-190.
316. Wang, P., Song, W., Mok, B.W., Zhao, P., Qin, K., Lai, A., Smith, G.J., Zhang, J., Lin, T., Guan, Y., Chen, H., 2009. Nuclear factor 90 negatively regulates influenza virus replication by interacting with viral nucleoprotein. *J Virol* 83, 7850-7861.

317. Wang, W., Cui, Z.Q., Han, H., Zhang, Z.P., Wei, H.P., Zhou, Y.F., Chen, Z., Zhang, X.E., 2008. Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells. *Nucleic acids research* 36, 4913-4928.
318. Wareing, M.D., Tannock, G.A., 2001. Live attenuated vaccines against influenza; an historical review. *Vaccine* 19, 3320-3330.
319. Watanabe, T., Watanabe, S., Kawaoka, Y., 2010. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell Host Microbe* 7, 427-439.
320. Watanabe, T., Watanabe, S., Noda, T., Fujii, Y., Kawaoka, Y., 2003. Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol* 77, 10575-10583.
321. Weis, W., Brown, J.H., Cusack, S., Paulson, J.C., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 1988. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333, 426-431.
322. Whelan, S.P., Barr, J.N., Wertz, G.W., 2004. Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 283, 61-119.
323. Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G., Chasin, L., 1979. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 1373-1376.
324. Winston, F., Carlson, M., 1992. Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet* 8, 387-391.
325. Wise, H.M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R.M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E.C., Barclay, W.S., Digard, P., 2009. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* 83, 8021-8031.
326. Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Cote, J., Wang, W., 1998. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell* 2, 851-861.
327. Yamanaka, K., Ishihama, A., Nagata, K., 1990. Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *The Journal of biological chemistry* 265, 11151-11155.
328. Yanguéz, E., Nieto, A., 2011. So similar, yet so different: selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. *Virus research* 156, 1-12.
329. Yap, K.L., Zhou, M.M., 2010. Keeping it in the family: diverse histone recognition by conserved structural folds. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45, 488-505.
330. Yap, K.L., Zhou, M.M., 2011. Structure and Mechanisms of Lysine Methylation Recognition by the Chromodomain in Gene Transcription. *Biochemistry*.
331. Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T., Ishihama, A., 1993. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* 196, 249-255.
332. Young, R.J., Content, J., 1971. 5'-terminus of influenza virus RNA. *Nature: New biology* 230, 140-142.
333. Yuan, H., Puckett, S., Lyles, D.S., 2001. Inhibition of host transcription by vesicular stomatitis virus involves a novel mechanism that is independent of phosphorylation of TATA-binding protein (TBP) or association of TBP with TBP-associated factor subunits. *J Virol* 75, 4453-4458.
334. Yuan, P., Bartlam, M., Lou, Z., Chen, S., Zhou, J., He, X., Lv, Z., Ge, R., Li, X., Deng, T., Fodor, E., Rao, Z., Liu, Y., 2009. Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* 458, 909-913.
335. Zebedee, S.L., Lamb, R.A., 1988. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *Journal of Virology* 62, 2762-2772.
336. Zegerman, P., Canas, B., Pappin, D.,



- Kouzarides, T., 2002. Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *The Journal of biological chemistry* 277, 11621-11624.
337. Zhang, Y., 2006. It takes a PHD to interpret histone methylation. *Nature structural & molecular biology* 13, 572-574.
338. Zhirnov, O.P., Klenk, H.D., 1997. Histones as a target for influenza virus matrix protein M1. *Virology* 235, 302-310.
339. Zinner, R., Albiez, H., Walter, J., Peters, A.H., Cremer, T., Cremer, M., 2006. Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones. *Histochem Cell Biol* 125, 3-19.
340. Zurcher, T., de la Luna, S., Sanz-Ezquerro, J.J., Nieto, A., Ortin, J., 1996. Mutational analysis of the influenza virus A/Victoria/3/75 PA protein: studies of interaction with PB1 protein and identification of a dominant negative mutant. *The Journal of general virology* 77 ( Pt 8), 1745-1749.





**1. CHD6 chromatin remodeler is a negative modulator of influenza virus replication that relocates to inactive chromatin upon infection. Cellular Microbiology (*submitted*)**

**CHD6 chromatin remodeler is a negative modulator of influenza virus replication that relocates to inactive chromatin upon infection.**

Roberto Alfonso<sup>1,2</sup>, Thomas Lutz<sup>1,2,#</sup>, Ariel Rodriguez<sup>1,2,#</sup>, J. Pablo Chavez<sup>1,2</sup>, Paloma Rodriguez<sup>1,2</sup>, Silvia Gutierrez<sup>1</sup> and Amelia Nieto<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>Centro Nacional de Biotecnología. C.S.I.C. Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Ciber de Enfermedades Respiratorias, Mallorca, Illes Balears, Spain

#Footnote: T. Lutz and A. Rodriguez contributed equally to this work

Running title: Viral recruitment of CHD6 to inactive chromatin

\*Corresponding author: Amelia Nieto, Centro Nacional de Biotecnología, C.S.I.C., Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Telephone 34 91 5854914 FAX 34 91 5854506

E-mail: [anieto@cnb.csic.es](mailto:anieto@cnb.csic.es)

## ABSTRACT

The influenza virus establishes close functional and structural connections with the nucleus of the infected cell. Thus, viral ribonucleoproteins (RNPs) are closely bound to chromatin components and the main constituent of viral RNPs, the NP protein, interacts with histone tails. Using a yeast two-hybrid screening, we previously found that the PA influenza virus polymerase subunit interacts with the CHD6 protein, a member of the CHD family of chromatin remodelers. Here we show that CHD6 also interacts with the viral polymerase complex and colocalizes with viral RNPs in the infected cells. To study the relationships between RNPs, chromatin and CHD6, we have analyzed whether NP and CHD6 binds to peptides representing trimethylated lysines of histone 3 tails that mark transcriptionally active or inactive chromatin. Upon infection, NP binds to marks of repressed chromatin and, interestingly an important recruitment of CHD6 to these heterochromatin marks occurs in this situation. In addition, a decreased accumulation of a mark of transcriptionally active chromatin is observed within the infected cells. Silencing experiments indicate that CHD6 acts as a negative modulator of influenza virus replication, hence, the CHD6 association with inactive chromatin could be part of a process where the influenza virus triggers modifications of chromatin components that could contribute to the pathogenic events used by the virus to induce host cell shut-off.

## INTRODUCTION

The influenza virus genome consists of eight segments of single-

stranded and negative sense RNAs (vRNAs). For genome expression, it has to form ribonucleoprotein complexes (RNPs) in which four viral proteins are essential constituents: the nucleoprotein (NP) and the three subunits of the polymerase (PB1, PB2 and PA) (Detjen *et al.*, 1987, Horisberger, 1980, Huang *et al.*, 1990, Kimura *et al.*, 1992, de la Luna *et al.*, 1993). Upon entry into a susceptible cell, these RNPs are transported to the nucleus where transcription and replication take place (reviewed in (Elton *et al.*, 2005b)). Transcription involves the synthesis of capped and polyadenylated viral mRNAs and it is primed by short-capped oligonucleotides of around 10 to 12 nucleotides. These oligonucleotides are scavenged from newly synthesized RNA polymerase II (RNAP II) transcripts by a viral polymerase endonuclease activity (Bouloy *et al.*, 1978, Plotch *et al.*, 1981). Therefore, functional coupling between viral and cellular transcription has been suggested. Indeed, the viral polymerase interacts with the largest subunit of the RNAP II complex (Engelhardt *et al.*, 2005), as well as with a large number of cellular proteins related to transcription such as Ebp-1 (*Erb-B3 binding protein 1*) (Honda *et al.*, 2007), DDX5 (Jorba *et al.*, 2008) or hCLE (Huarte *et al.*, 2001, Pérez-González *et al.*, 2006). Recent genome-wide screenings have shown that a large number of cellular factors belonging to multiple functional categories participate in the viral life cycle (Karlás *et al.*, 2010, König *et al.*, 2009, Brass *et al.*, 2009, Shapira *et al.*, 2009). Viral RNA replication involves the synthesis of cap-independent, full-length positive-stranded RNAs complementary to the genomic vRNAs, which serve as a template for the amplification of the vRNAs. Viral replication has been proposed to take place in DNase insensitive nuclear fractions that include



chromatin and/or cellular matrix (Takizawa *et al.*, 2006). Accordingly, it has been described that viral ribonucleoproteins are closely bound to the nuclear matrix or to chromatin components (Bukrinskaya *et al.*, 1979, Jackson *et al.*, 1982, Lopez-Turiso *et al.*, 1990, Bui *et al.*, 2000). This binding may be mediated at least in part through interaction of NP with nucleosomes, since NP interacts with histone tails *in vitro* (Garcia-Robles *et al.*, 2005). Similarly, *in vitro* binding experiments suggest that viral matrix protein (M1) interacts non-specifically with core histones (Zhirnov *et al.*, 1997). In addition, interactions have been described between the RNPs and PARP-1 (the chromatin-associated enzyme *poly-adenyl-ribosyl-polymerase 1*) or DDB1 (the DNA binding protein associated with a centromeric complex) (Mayer *et al.*, 2007), as well as between the MCM complex, a replicative DNA helicase, and the PA subunit (Kawaguchi *et al.*, 2007).

The basic repeating unit of chromatin is the nucleosome, which contains two copies of the core histones H2A, H2B, H3 and H4 (Kornberg *et al.*, 1999). The packaging of DNA into nucleosomes and higher structures represents an obstacle to gene expression and chromatin remodelers facilitate the recruitment of specific and general transcription factors to their DNA targets for transcriptional control (Clapier *et al.*, 2009). There are two distinct categories of enzymes that remodel chromatin: those that mediate post-translational modifications of histones, and those that use the energy from ATP hydrolysis to alter the interactions between histones and DNA within the nucleosome (Mellor, 2005, Berger, 2007). CHD proteins (chromodomain-helicase DNA-binding) are a family of chromatin remodelers belonging to the latter type, which contain two N-terminal chromodomains that interact

with methylated histone tails. This interaction contributes to the dynamics of chromatin structure, which affects the binding of transcription factors and, therefore, modulate the initiation and elongation steps of transcription (Flanagan *et al.*, 2005, Sims *et al.*, 2005, Clapier *et al.*, 2009). We previously described the interaction of influenza virus polymerase PA subunit with the CHD6 chromatin remodeler through a yeast two-hybrid screening (Huarte *et al.*, 2001). The CHD6 protein belongs to the recently described third CHD subfamily comprised of CHD6-CHD9 proteins (Schuster *et al.*, 2002). The relation of CHD6 with mRNA transcription machinery is known (Lutz *et al.*, 2006) as is its interaction with Nrf2, a transcription factor that plays a crucial role in maintaining the cellular redox state (Nioi *et al.*, 2005). On the other hand, we have observed that mice with a CHD6 gene deletion, which abolishes the ATPase activity, present an ataxic phenotype (Lathrop *et al.*, 2009).

Besides CHD6 associating with the PA viral polymerase subunit, we describe here that it also associates with the influenza virus polymerase complex and colocalizes with viral RNPs. Silencing experiments indicate that CHD6 is a negative modulator of influenza virus replication and, moreover, its association with specific methylated residues of histone tails that mark repressed chromatin increases greatly upon influenza virus infection. In addition, a global decrease on a transcriptionally active chromatin mark is observed upon viral infection.

## RESULTS

## Identification of CHD6 as a protein that interacts with influenza virus polymerase

In search of cellular factors that would interact with influenza virus polymerase, a two-hybrid screening in yeast with PA protein from A/Victoria/3/75 (VIC) strain as bait was carried out. As previously described (Huarte *et al.*, 2001), two clones were isolated and confirmed as positives since they fulfilled all controls in the two-hybrid interaction protocol (see Experimental procedures). One clone was further characterized as the hCLE/c14orf166 protein (Huarte *et al.*, 2001), which is a positive modulator of the RNAP II activity (Pérez-González *et al.*, 2006). The other clone had an insert corresponding to a human genomic DNA sequence present in the databases (HS620E11) and was further identified as the gene encoding CHD6, a protein belonging to a family of chromatin remodelers (Huarte *et al.*, 2001). The two-hybrid analysis was done with pGBT-PA and pGBTPA $\Delta$ 1-154 plasmids that express a GAL4-fusion protein with the entire PA or an N-terminal deletion of PA protein, respectively. Both proteins were positive in the interaction assay with CHD6, indicating that the first N-terminal third of PA is not required for binding (Fig. 1A).

The viral RNPs (PA, PB1 and PB2 polymerase complex bound to viral RNA wrapped by NP protein) are essential for influenza virus life cycle since they perform all the activities required for viral RNA expression. Therefore, we examined whether CHD6 also interacts with the viral polymerase complex and colocalize with the viral RNPs. Thus HEK293T cells were infected with the VIC strain and co-immunoprecipitation analyses were carried out using

an anti-CHD6 antibody. All three polymerase subunits associated with CHD6 (Fig. 1B), whereas a control antibody (C), did not immunoprecipitate any of the individual polymerase subunits (Fig.1B). The *in vivo* association of CHD6 and viral RNPs was examined by performing colocalization studies of CHD6 and their main component, the NP protein, in influenza virus infected A549 cells. In agreement with the observed association of CHD6 with the viral polymerase, colocalization of CHD6 and NP was obtained (Fig. 1C). In addition to the CHD6-NP colocalization, a change in the distribution pattern of CHD6 upon viral infection was observed (compare CHD6 pattern in MOCK and 9 hpi). Therefore, CHD6 interacts with PA as well as with the entire polymerase complex following infection with the influenza virus.

#### ***In vitro* association of CHD6 to markers of inactive chromatin increases in influenza virus infected cells**

The interaction of CHD6 chromatin remodeler with the viral polymerase coincides with previous reports describing the functional and structural association of viral RNPs with the host cell chromatin. In influenza virus-infected cells, vRNPs are tightly associated with the nuclear matrix, in agreement with results showing that the synthesis of influenza virus vRNAs takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction (Lopez-Turiso *et al.*, 1990). Previous reports analyzed the binding of influenza virus RNPs and purified NP protein, to purified nucleosomes, reconstituted histone octamers and purified single histones (Garcia-Robles *et al.*, 2005). Both vRNPs and NP proteins were capable of binding nucleosomes. Using purified histones to reconstitute an octamer particle, the vRNP-histone

association was found to occur through the histone tails (Garcia-Robles *et al.*, 2005). However, how histone tail posttranslational modifications modulate vRNPs association with nucleosomes is completely unexplored. In addition, it is also unknown whether influenza virus vRNPs associate with active or inactive chromatin within the infected cells. Different explanations have been proposed for the vRNP-histone interaction such as its role in vRNP transport or facilitating the proximity of vRNPs to the cellular transcription machinery for the cap-snatching process.

Cellular transcription initiation and elongation are both associated with specific chemical modifications of the histone components of the nucleosomes residing in the promoter regions and transcribed portions of active coding genes (Jenuwein *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2007). Generally, active genes correlate with the presence of methylation at lysines 4, 36 and 79 of histone 3 tail (H3K4, H3K36, and H3K79) and silent genes correspond to the occurrence of methylation at lysines 9 and 27 of histone 3 tail and lysine 20 of histone 4 tail (H3K9, H3K27, and H4K20) (Berger, 2007). To characterize whether vRNP associates with active or inactive chromatin, *in vitro* histone pull-down analyses were carried out. Synthetic biotin-conjugated peptides from the N-terminal tail of histone 3 (1-21) or (22-44), either unmethylated or trimethylated in lysines residues 4, 9 or 27, were fixed to agarose-avidin resins and used for pull-down assays with nuclear extracts of HEK293T infected cells at 9 hpi examining the presence of NP protein by Western blot. An important retention in H3K9me3 and H3K27me3 containing resins was observed (Fig. 2A), indicating that at late time post infection (9 hpi) viral RNPs are mainly associated to inactive chromatin.

Functional studies have shown that the chromodomain serves as a module that mediates chromatin interactions by binding directly to DNA, RNA, and methylated histone H3 (Flanagan *et al.*, 2005). Indeed, the two chromodomains of human CHD1, another member of the CHD family, are required to bind to trimethylated H3K4 (H3K4me3) (Flanagan *et al.*, 2005, Sims *et al.*, 2005). Other proteins containing chromodomains, such as the heterochromatin-associated protein 1 (HP1 $\alpha$ ) and Polycomb, recognize the methylated lysines that correlate with silent genes, specifically methylated marks in H3K9 and H3K27, respectively (Fischle *et al.*, 2003). Since CHD6 contains chromodomains that could bind methyl histone marks and also interacts with viral RNPs, which associate to inactive chromatin at late time post-infection, we evaluated the CHD6 pattern of chromatin association both in uninfected and influenza virus infected cells. The behavior of a different chromatin remodeler belonging to subfamily II of the CHD family, the CHD3 protein and HP1 $\alpha$  was also evaluated. No CHD6 binding preference for any chromatin mark was observed in uninfected cells. As previously described, HP1 $\alpha$  was specifically associated with the H3K9me3 group (Fischle *et al.*, 2003, Bannister *et al.*, 2001). CHD3 was strongly retained by resins containing H3K9me3 as well as by those having unmethylated H3 (1-21) peptide, (Fig. 2B, left), which was in accordance with previous data (Hall *et al.*, 2007, Zegerman *et al.*, 2002).

Next, similar pull-down experiments were carried out with nuclear extracts of HEK293T infected cells at 9 hpi. The results (Fig. 2B, right) show a significant CHD6 retention in resins containing H3K9me3 or H3K27me3 peptides in this situation. In contrast, no variation of HP1 $\alpha$  and CHD3



association was found. Therefore influenza virus infection triggers the association of CHD6 with repressed chromatin.

### ***In vivo* association of CHD6 to markers of inactive chromatin increases in influenza virus infected cells**

Taking into account the recruitment of CHD6 to peptides representing inactive chromatin, we wondered whether this recruitment also takes place *in vivo* upon infection with the influenza virus. Confocal immunofluorescence studies were carried out using antibodies that detect CHD6 and H3K4me3, H3K9me3 and H3K27me3. The confocal immunofluorescence analyses were performed using single confocal sections and the colocalization mask to obtain binary images showing only overlapping pixels (white spots), (see Experimental procedures). In uninfected A549 cells we found that CHD6 co-localizes with H3K4me3 and more weakly with H3K9me3 and H3K27me3 (Fig. 3; MOCK, CHD6-H3Kme3 panels). Hence, it appears that the protein is preferentially present in transcriptionally active sites, in agreement with its presence at spots where mRNA synthesis is taking place (Lutz *et al.*, 2006).

Next, the co-localization of CHD6 with the different trimethylated lysine residues of histone 3 tails during influenza virus infection was examined (Fig. 3; 9 hpi, CHD6-H3Kme3 panels). In A549 infected cells, besides the previously described changes in the CHD6 distribution (see Fig. 1C), an important increase in the colocalization of CHD6-H3K9me3 took place (from 24% to 66%). In addition, a moderate increase in the colocalization of CHD6-H3K27me3 occurred (from 45% to 55%), whereas CHD6-H3K4me3 colocalization did not show significant variations. Detection of

viral nucleoprotein was always examined at the same time to assess the infection (data not shown). A quantitative analysis of these changes is shown in the graphic in which the respective colocalizations in every cell present in three confocal sections of three different experiments have been examined. Despite the redistribution of CHD6, there was no obvious modification in the pattern of the trimethylated lysines in infected cells (Fig. 3, H3Kme3 panels). In agreement with the strong co-localization of H3K4me3 with nascent RNA (Zinner *et al.*, 2006), this marker was distributed throughout the nucleoplasm. By contrast, H3K9me3 and H3K27me3 were enriched along the nuclear border and around the nucleoli (see also below Supp. mat. 1), in accordance with previous observations (Zinner *et al.*, 2006) and with their role in transcriptional repression. Thus, influenza virus infection stimulates the recruitment of CHD6 to inactive chromatin at late time post infection.

### **CHD6 does not mediate viral RNPs-inactive chromatin association**

Data so far indicates that both CHD6 and vRNPs accumulate at inactive chromatin at late time post-infection (Figs. 2 and 3). Therefore, we wonder whether chromatin remodeler CHD6 is needed for vRNPs association to this chromatin area. The opposite was also considered since CHD6 could be recruited to H3K9me3- and H3K27me3-rich regions through binding to vRNPs. To distinguish between these two possibilities, we constructed stable silenced A549 cells that are derived from human alveolar basal epithelial cells (Kuiken *et al.*, 2008). Two different CHD6 silencers were introduced into the cells, siCHD6.1 and siCHD6.2. In addition, a stable A549 cell line was constructed containing a control silencer previously used in our silencing

studies (Burgui *et al.*, 2007). The content of CHD6 in the three A549 cell lines was evaluated by Western blot (Fig. 4A left). The two silenced CHD6 cell lines presented a decreased accumulation of CHD6 compared with TM cells, this decrease being higher in the case of siCHD6.2 silencer that showed a reduction of 90% on CHD6 accumulation. Confocal microscopy studies with these last cells were also carried out in which a decreased accumulation of CHD6 was clearly observed compared with the TM cell line (Fig. 4A, right).

Next, control A549 (TM) and CHD6-silenced cells (siCHD6.2) were infected with the influenza virus and the viral RNPs association with inactive chromatin was analyzed by confocal immunofluorescence studies at 9 hpi (Fig. 4B). The NP protein was mainly located at the nuclear periphery in agreement with previous publications describing this localization at late time post infection (Elton *et al.*, 2005a). Colocalization of NP was higher with the H3K9me3 than with the other inactive chromatin mark, the H3K27me3 marker. More importantly, the RNP-chromatin association behaved similarly in control and CHD6 silenced cells indicating that CHD6 is not the mediator of that association and suggesting that the viral RNPs could, at least in part, be involved in triggering CHD6 recruitment to inactive chromatin during infection.

### **Effect of CHD6 silencing on influenza virus replication**

The results presented above suggest that CHD6 could be relevant for the influenza virus life cycle. Natural infections with the influenza virus occur at low moi and take place in the epithelium of the respiratory

tract. Thus, to establish the potential CHD6 significance, we infected TM, siCHD6.1 and siCHD6.2 A549 cells with influenza virus at low multiplicity and analyzed the viral titers along the infection time. The amounts of CHD6 and PA polymerase subunit were also examined and detection of  $\beta$ -tubulin was carried out as loading control. CHD6 accumulation remained lower in CHD6-silenced cells than in control TM cells all along the infection period, whereas PA accumulation was clearly higher in the CHD6-silenced cells than in the control TM infected cells (Fig. 5A). Very interestingly, an increase in virus production in CHD6 silenced cells was obtained, around 5 and 10 times higher in siCHD6.1 and siCHD6.2 cells compared to TM control cells, respectively. Moreover, virus production showed an inverse correlation with CHD6 reduction levels as shown by Western blot (Fig. 5B). This data clearly indicates that the chromatin remodeler CHD6 works as a negative modulator of influenza virus replication.

### **Analysis of lysine methylation in histone 3 tails in influenza virus infected cells**

Influenza virus infection triggers an important inhibition of cellular mRNA synthesis together with RNAP II degradation (Rodriguez *et al.*, 2007, Vreede *et al.*, 2010) causing profound alterations in the host cell genome expression apparatus. Accordingly, viral infection provokes significant modifications in CHD6 chromatin association. To evaluate whether influenza virus infection provokes general effects on chromatin dynamic we studied both, the possible alterations in the distribution pattern and the accumulation levels of active and inactive chromatin markers along the infection cycle.

Our previous data indicated that the nuclear distribution of chromatin markers did not show significant variations at 9 h post-infection (Fig. 3). However these results did not discard possible changes at earlier or later times during the infection cycle. Thus, examination of intranuclear localization of H3K4me3, H3K9me3 and H3K27me3 histone markers was studied in uninfected and infected A549 cells at high moi, both at 6 and 12 h post-infection. The results (Supp. mat. 1) indicate that no variations occur in their nuclear distribution all along the infection time. Next, we analyzed possible changes in the accumulation levels of these chromatin markers in this situation. Cultured A549 cells were mock-infected or infected with influenza virus and accumulation levels of H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 and total histone 3 were examined using the corresponding antibodies. Western blots for viral PA and PB1 polymerase subunits and cellular  $\beta$ -tubulin proteins were carried out as controls for viral infection progression and protein load, respectively (Fig. 6). A decrease in the “open”-chromatin marker was observed (Fig. 6A, H3K4me3). H3K4me3- $\beta$ tubulin ratios were quantified in three different experiments and a reduction of about 35% was detected at the end of the infection (Fig. 6B). In contrast, either the amount of “closed”-chromatin markers or total levels of histone 3, remained constant all along the infection (Fig. 6C). Since no variations were found in histone 3 accumulation, the observed decrease in H3K4me3 should be due to its demethylation rather than to protein degradation.

## DISCUSSION

### ***Viruses manipulate cellular chromatin***

Viruses need to navigate through a variety of host cell compartments to complete their life cycle and chromatin represents a challenge for viral gene expression. Like cellular DNA, the genomes of some DNA viruses that replicate within the nucleus, or RNA viruses like HIV, which are integrated into the host genome, also associate with chromatin. These viruses frequently recruit proteins involved in chromatin remodeling and histone modification into viral replication compartments (for a review see (Lieberman, 2006)). Consequently, interaction of viral proteins with chromatin-related factors has been described. Among others, the interaction of VP16 (Neely *et al.*, 1999) or ICP8 (Taylor *et al.*, 2004) from herpes simplex virus-1, IE86 of human cytomegalovirus (Reeves *et al.*, 2006), the EBNA2 from Epstein-Barr (Wu *et al.*, 2000), or the papillomavirus E2 protein (Kumar *et al.*, 2007, Smith *et al.*), has been reported.

While the influenza virus does not integrate into the host genome, vRNPs are actively transported into the nucleus where transcription and replication occur early in infection, and they are found to be tightly associated with chromatin. As a consequence of its particular mechanism of transcription, the influenza virus requires an early and tight functional association with the host genome expression apparatus and therefore modulation of the chromatin state can be important for this coupling.

### ***Possible role of influenza virus RNPs-chromatin association***

Influenza virus vRNPs associate with chromatin that corresponds to transcriptionally inactive sites together with CHD6 at late time post infection



(Figs. 2 and 3). What might be the physiological significance of the association of vRNP with the silent chromatin enriched at the nuclear periphery? Once synthesis of new vRNPs takes place, M1 binds to them facilitating their transport into the cytoplasm. M1 binds to the globular domains of histone octamers, while vRNPs interact with histone tails (Garcia-Robles *et al.*, 2005). It has been speculated that interactions with histone tails could modulate the release of vRNPs from chromatin. Hence, it is possible that the vRNP-H3K9me3 and vRNP-H3K27me3 interactions could cooperate to reorganize cellular chromatin in order to promote the efficient release of newly synthesized vRNPs. In fact, recent data shows how these chromatin regions seem to be more dynamic than previously expected, highlighting the role of heterochromatin as a platform for the recruitment and spreading of regulatory proteins implicated in various aspects of chromosome biology (see for a review (Grewal *et al.*, 2007)).

### ***Potential implications of CHD6-influenza virus RNP interaction***

Histone tails are subject to a vast array of posttranslational modifications including methylation and acetylation, which modulate the dynamics from active to inactive chromatin (for a review see (Li *et al.*, 2007)). CHD6 association with the various markers of active and repressed chromatin suggests that CHD6 may act as both activator and repressor (Fig. 2 and 3). Accordingly, it should be mentioned that it functions as coactivator for the cellular Nrf2 transcription factor (Nioi *et al.*, 2005). In addition, its presence at spots where mRNA synthesis is taking place (Lutz *et al.*, 2006) and its preferential colocalization with markers of active chromatin

presented in Fig. 3 support this role as activator. However, a negative role for CHD6 on viral gene expression has been recently described in high-risk human papillomavirus (HPV) (Fertey *et al.*). Expression of the E6 and E7 oncogenes of HPV is controlled by cellular transcription factors and by viral E8;E2C protein that binds and represses the E6/E7 promoter. This inhibition seems to be due to binding site competition with cellular transcription and to interaction of cellular transcription modulators with E8;E2C. The evidence provided indicates that CHD6 interacts with the E8;E2C protein and describes how this association contributes to the transcriptional repression of the human papillomavirus E6/E7 oncogen promoter (Fertey *et al.*).

In the case of influenza virus infection, the association data suggest that CHD6 could have a negative role on the influenza virus cycle since infection triggers its nuclear rearrangement to transcriptionally repressed places and therefore the influenza virus replicates more efficiently in CHD6-silenced cells (Fig. 5). Taking into account its described role as cellular transcriptional activator it is possible that CHD6 may function as a competitor of the influenza virus polymerase complex for the transcriptionally active sites required for viral transcription.

### ***Chromatin alterations triggered by influenza virus infection***

Histone methylation is fundamental to gene regulation and despite the previous consideration that this modification was static, several studies have demonstrated that the global turnover of the histone methyl group occurs at a rate similar to histone turnover. Some viruses modulate histone modification for an efficient viral replication cycle. For instance, *Paramecium bursaria*

chlorella virus-1, a large double-stranded DNA virus of the Phycodnaviridae family, encodes a lysine methyltransferase, which is linked to host transcription inhibition, probably by methylating histone H3 at Lys 27 (Mujtaba *et al.*, 2008). During adenovirus replication, the E4-ORF3 viral protein inactivates p53 by forming a nuclear structure that induces de novo H3K9me3 heterochromatin formation at p53 target promoters (Soria *et al.*). Moreover, there are examples of viruses with episome genomes that heavily depend on histone demethylases to complete their life cycle. For instance herpes simplex virus and varicella zoster recruit the lysine demethylase-1 (LSD1), which can demethylate mono and dimethylated H3K4 and H3K9, to the immediate early viral promoters, thus facilitating the expression of viral immediate early genes (Liang *et al.*, 2009). LSD1 demethylase is partially degraded upon infection with herpes simplex virus 1 (Gu *et al.*, 2009) and associates with the Epstein-Barr virus latency promoter (Chau *et al.*, 2008). On the other hand, SMCX protein, which mediates demethylation of di- and trimethylated H3K4, is involved in E2-mediated repression of the papillomavirus oncogenes (Smith *et al.*, 2010).

The influenza virus does not integrate into the host genome although, since it depends upon the host cell transcriptional apparatus, it is affected by the regulatory impact of chromatin modifications. Besides the association of CHD6 with silent chromatin following influenza virus infection, we also show a specific decrease in the most recognized marker of transcriptionally active chromatin, H3K4me3 modification. H3K4me3 enrichment around the transcription start site and the 5' end of the open reading frame is known to promote transcription elongation and regulate RNA processing events

(Santos-Rosa *et al.*, 2002, Sims *et al.*, 2007). The global downregulation of H3K4me3 could be the consequence of transcription elongation inhibition and cellular RNAP II degradation, which occurs during influenza virus infection (Rodriguez *et al.*, 2007, Rodriguez *et al.*, 2009, Vreede *et al.*, 2010). Finally, all the aforementioned activities could cooperate to decrease the expression of the infected cells and they could act as an additional pathogenic mechanism by which the influenza virus produces efficient cell host shut-off.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

The HEK293T and A549 cell lines were used in this study, as was the influenza virus A/Victoria/3/75 (VIC) strain. A recombinant virus, containing the RNPs genes from the VIC strain and the rest from the A/WSN/33 strain, was used for viral growth studies in A549 cells. This virus made possible a trypsin-independent infection in the trypsin-susceptible A549 cells (Huarte *et al.*, 2003). The biotin-conjugated peptides representing the N-terminal tails of histone 3 were obtained from Millipore. The avidin resins were from Pierce and the “Complete” protease inhibitor was purchased from Roche.

### **Two-hybrid screen**

A yeast two-hybrid screen was performed as described previously (Huarte *et al.*, 2001). Essentially, the PA cDNA from the VIC strain or the cDNA of PA with a 154 N-terminal amino acid deletion were cloned into the pGBT9 vector (GBD-PAwt and GBD-PA $\Delta$ 1-154 respectively), and the resulting plasmid was used to screen a human kidney cDNA fusion library

cloned into the pGAD vector. The procedures for library amplification, yeast cell transformation, and screening for growth in the absence of histidine and  $\beta$ -galactosidase activity were those recommended in the Matchmaker protocol (Clontech). Under the conditions used, transformation of *S. cerevisiae* with plasmid pGBD-PA did not stimulate growth of the cells in the absence of histidine. Positive pGAD plasmids were rescued by transformation into *E. coli* MH4 (Leu<sup>-</sup>) cells, which were selected on M9 plates lacking leucine. Cotransformation with the human kidney cDNA fusion library constructed in plasmid pGAD led to the growth of about 3,000 independent clones after screening 4 million colonies. Thirty-two of them were positive in the  $\beta$ -galactosidase assay with 2.5 mM 3-aminotriazole and two of them were still strong positives in the presence of 10 mM 3-aminotriazole. These two clones (hCLE and CHD6) were confirmed as positives after isolation of the plasmids and retransformation, and they fulfilled all controls in the two-hybrid interaction protocol.

### **Construction of CHD6-silenced cells**

Two CHD6-silencing pSuperRetro Puro plasmids (siCHD6.1 and siCHD6.2) expressing short hairpin RNAs targeting CHD6 mRNA corresponding to positions 4539-4559 and 4795-4813 respectively, were generated according to the manufacturer's instructions (Oligoengine). These short hairpins showed no homology to other gene sequences. Control plasmid pSuperRetro Puro (TM) expresses a nonsilencing short hairpin RNA derived from a transcript of the bacterium *Thermotoga maritima* and does not target any known mammalian gene (Burgui *et al.*, 2007, de Lucas *et al.*, 2010) (the

targeted sequence is AATTCTCCGAACGTGTCACGT).

Control or stable A549 CHD6-silenced cells were obtained by transfection of TM, siCHD6.1 or siCHD6.2 plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) followed by selection with 0.5 µg/ml puromycin.

### **Virus infection**

For infections at high multiplicity, cells were infected at a multiplicity of infection (moi) of 3 pfu/cell, and fixed at different hours post infection (hpi) for immunofluorescence analysis or they were lysed in Laemmli buffer (Sambrook, 1989) for Western blotting. For virus titer analysis the cells were infected at  $10^{-3}$  pfu/cell and the particle production was evaluated by plaque assay.

### **Western blotting**

Western blotting was carried out as described previously (Rodriguez *et al.*, 2007). The following primary antibodies were used: for CHD6, an affinity-purified antibody using an epitope specific to CHD6 immobilized on a solid support (cat no. A301-221A) (1:1000) from Bethyl Laboratories; for CHD3, a rabbit polyclonal antibody (cat no. A301-219A) (1:300) from Bethyl Laboratories; for PA, monoclonal antibodies 2 and 9 (1:20 each) (Bárcena *et al.*, 1994); for PB2, monoclonal antibodies 8 and 22 (1:100 each) (Bárcena *et al.*, 1994); for PB1, a rabbit polyclonal antibody (1:1000) (Gonzalez *et al.*, 1999); for nucleoprotein (NP), a rat polyclonal antibody generated with the use of a His-NP protein expressed and purified from bacteria as an antigen (1:2000); for β-tubulin, a mouse monoclonal antibody (1:15000) from



Sigma; for H3K4me3, H3K9me3 and H3K27me3, polyclonal antibodies (cat no. 39160, 39162 and 39157, respectively) (1:1000); for H3, a polyclonal antibody (cat no. 39164) (1:5000); for HP1 $\alpha$ , a polyclonal antibody (cat. no. 39296) (1:1000) all from Active Motif.

### **Immunoprecipitation**

Immunoprecipitation studies were performed as described previously (Lutz *et al.*, 2006). Briefly, 10<sup>7</sup> HEK293T cells were mock-infected or infected with influenza virus at 3 pfu/cell. At 7 hpi, the cells were collected and lysed in buffer containing 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl pH 8.5 and 0.5% Igepal, with “complete” protease inhibitors. The lysate was centrifuged at 10,000g and the supernatant was used for immunoprecipitation studies using the anti-CHD6 (polyclonal antiserum from Bethyl Laboratories) or an unrelated antibody. The immunocomplexes recovered were washed ten times with lysis buffer and the immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blots.

### **Immunofluorescence**

MOCK-infected or infected A549 cells were fixed with 3.7% formaldehyde for 20 minute at room temperature and stored in PBS. Fixed cells were permeabilized and incubated in PBS/0.1% (w/v) BSA with the following primary antibodies: rat polyclonal antibody anti NP (1:4000), a mouse monoclonal antibody anti CHD6 (1:10) from Abcam (cat. no. Ab51330), anti CHD3 (1:500) from Bethyl Laboratories and rabbit polyclonal antibodies against H3K4me3, H3K9me3 or H3K27me3 (1:500), all from Active Motif. The samples were observed by confocal microscopy

with a BioRad Radiance 2100 laser scanning system on a Zeiss Axiovert 200 microscope using a 63 x 1.4 oil immersion objective. 1024x1024 pixel images were acquired sequentially to avoid bleed-through effect with the LaserSharp 2000 v.5 software (BioRad). For colocalization studies, single confocal sections with 3-5 cells from three independent experiments were thresholded to establish the background correction (from 70-90 to 255 gray scale levels for CHD6 signal, 80-90 to 255 gray scale levels for NP signal and 110-120 to 252 gray scale levels for H3K4me3, H3K9me3 and H3K27me3), processed with LaserPix v.4 image software (adaptation for BioRad of ImagePro Plus, Media Cybernetics, LP) and binary images obtained with the colocalization mask showing only overlapping pixels were obtained. Quantitative analysis was reported as the percentage of the thresholded area of CDH6 signal which overlays with the corresponding thresholded area of the H3Kme3 signal. This percentage was obtained from the previous segmented and calibrated images analyzed with the colocalization module of MetaMorph Premier v.7.5.2 software (Molecular Devices Inc., CA), Average, standard deviation and statistical significance determined by Student's T-test values were calculated.

### **Binding of CHD6 to histone 3 peptides *in vitro***

Nuclear extracts from MOCK-infected or infected HEK293T cells were prepared using a protocol adapted from (Andersen *et al.*, 2002). Briefly, cells were resuspended in buffer A (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.5 mM DTT) and dounce homogenized ten times. The dounced nuclei were purified by centrifugation through a 0.35 M sucrose cushion

and lysed with buffer containing: 50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 % Igepal, 1 mM DTT, 10 % Glycerol and Benzonase. The extracts were precleared with avidin beads and the unbound material was incubated for 10-12 hours at 4° C with resins containing amino acids 1-21 of the histone 3 tail unmethylated or trimethylated at lysine 4 or 9, or amino acids 21-44 of the histone 3 tail unmethylated or trimethylated at lysine 27. About 4 µg of peptide and 10<sup>7</sup> cells were used for each pull-down. The beads were washed seven times with buffer containing 50mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% Igepal and “Complete” protease inhibitor cocktail, and the bound proteins were analyzed by Western blots.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to J. Ortín, A. Pérez-González, L. Ver, J. Iborra and C. Dunn for their criticisms on the manuscript. The technical assistance of Y. Fernández and N. Zamarreño is also gratefully acknowledged. R. Alfonso was a fellow of the Ministry of Science and Education. This work was supported by Ministerio de Educacion y Ciencia, Plan Nacional de Investigacion Científica, Desarrollo e Innovacion Tecnologica (BFU2008-00448), Comunidad de Madrid (S-SAL-0185-2006) and Ciber de Enfermedades Respiratorias.

## REFERENCES

- Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K., Lam, Y.W., Steen, H., *et al.* (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* **12**, 1-11.

- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120-124.
- Bárcena, J., S., d.I.L., Ochoa, M., Melero, J.A., Nieto, A., Ortín, J. and Portela, A. (1994). Monoclonal antibodies against the influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J. Virol.* **68**, 6900-6909.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407-412.
- Bouloy, M., Plotch, S.J. and Krug, R.M. (1978). Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4886-4890.
- Brass, A.L., Huang, I.C., Benita, Y., John, S.P., Krishnan, M.N., Feeley, E.M., *et al.* (2009). The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* **139**, 1243-1254.
- Bui, M., Wills, E.G., Helenius, A. and Whittaker, G.R. (2000). Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J Virol* **74**, 1781-1786.
- Bukrinskaya, A.G., Vorkunova, G.K. and Vorkunova, N.K. (1979). Cytoplasmic and nuclear input virus RNPs in influenza virus-infected cells. *J Gen Virol* **45**, 557-567.
- Burgui, I., Yángüez, E., Sonenber, N. and Nieto, A. (2007). Influenza mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation?. *J. Virol.* **81**, 12427-12438.
- Chau, C.M., Deng, Z., Kang, H. and Lieberman, P.M. (2008). Cell cycle association of the retinoblastoma protein Rb and the histone demethylase LSD1 with the Epstein-Barr virus latency promoter Cp. *J Virol* **82**, 3428-3437.
- Clapier, C.R. and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* **78**, 273-304.
- de la Luna, S., Martín, J., Portela, A. and Ortín, J. (1993). Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from SV40 recombinant viruses. *J. Gen. Virol.* **74**, 535-539.
- de Lucas, S., Peredo, J., Marion, R.M., Sanchez, C. and Ortin, J. (2010). Human Staufen1 protein interacts with influenza virus ribonucleoproteins and is required

- for efficient virus multiplication. *J Virol* **84**, 7603-7612.
- Detjen, B.M., St Angelo, C., Katze, M.G. and Krug, R.M. (1987). The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J Virol* **61**, 16-22.
- Elton, D., Amorim, M.J., Medcalf, L. and Digard, P. (2005a). 'Genome gating'; polarized intranuclear trafficking of influenza virus RNPs. *Biol Lett* **1**, 113-117.
- Elton, D., Digard, P., Tiley, L. and Ortín, J. (2005b) Structure and function of the influenza virus RNP. In *Contemporary topics in influenza virology*, Y. Kawaoka (ed.). Norfolk, Horizon Scientific Press.
- Engelhardt, O.G., Smith, M. and Fodor, E. (2005). Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J. Virol.* **79**, 5812-5818.
- Fertey, J., Ammermann, I., Winkler, M., Stoeger, R., Iftner, T. and Stubenrauch, F. Interaction of the papillomavirus E8;E2C protein with the cellular CHD6 protein contributes to transcriptional repression. *J Virol.* **84**, 9505-9515.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D. and Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* **17**, 1870-1881.
- Flanagan, J.F., Mi, L.Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., *et al.* (2005). Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* **438**, 1181-1185.
- Garcia-Robles, I., Akarsu, H., Muller, C.W., Ruigrok, R.W. and Baudin, F. (2005). Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology* **332**, 329-336.
- Gonzalez, S. and Ortín, J. (1999). Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J.* **18**, 3767-3775.
- Grewal, S.I. and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* **8**, 35-46.
- Gu, H. and Roizman, B. (2009). Engagement of the lysine-specific demethylase/HDAC1/CoREST/REST complex by herpes simplex virus 1. *J Virol* **83**, 4376-4385.
- Hall, J.A. and Georgel, P.T. (2007). CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochem Cell Biol* **85**, 463-476.
- Honda, A., Okamoto, T. and Ishihama, A. (2007). Host factor Ebp1: selective inhibitor of influenza virus transcriptase. *Genes Cells* **12**, 133-142.

- Horisberger, M.A. (1980). The large P proteins of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides. *Virology* 107, 302-305.
- Huang, T.S., Palese, P. and Krystal, M. (1990). Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol* 64, 5669-5673.
- Huarte, M., Falcón, A., Nakaya, Y., Ortín, J., García-Sastre, A. and Nieto, A. (2003). Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J. Virol.* 77, 6007-6013.
- Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J.J., Roncal, F., Ortín, J. and Nieto, A. (2001). PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J. Virol.* 75, 8597-8604.
- Jackson, D.A., Caton, A.J., McCready, S.J. and Cook, P.R. (1982). Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. *Nature* 296, 366-368.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Jorba, N., Juarez, S., Torreira, E., Gastaminza, P., Zamarreno, N., Albar, J.P. and Ortín, J. (2008). Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* 8, 2077-2088.
- Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K.P., Artarini, A., Heuer, D., *et al.* (2010). Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463, 818-822.
- Kawaguchi, A. and Nagata, K. (2007). De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. *EMBO J* 26, 4566-4575.
- Kimura, N., Mishida, M., Nagata, K., Ishihama, A., Oda, K. and Nakada, S. (1992). Transcription of a recombinant influenza virus RNA in cells that can express the influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein genes. *J. Gen. Virol.* 73, 1321-1328.
- Konig, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Heinrich Hoffmann, H., Bhattacharyya, S., *et al.* (2009). Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463, 813-817.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285-294.
- Kuiken, T. and Taubenberger, J.K. (2008). Pathology of human influenza revisited. *Vaccine* 26 Suppl 4, D59-66.



- Kumar, R.A., Naidu, S.R., Wang, X., Imbalzano, A.N. and Androphy, E.J. (2007). Interaction of papillomavirus E2 protein with the Brm chromatin remodeling complex leads to enhanced transcriptional activation. *J Virol* **81**, 2213-2220.
- Lathrop, M., Chakrabarti, L., Eng, J., Rhodes, H., Lutz, T., Nieto, A., *et al.* (2009). Deletion of the Chd6 exon 12 affects motor coordination. *Mammalian genome*.
- Li, B., Carey, M. and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707-719.
- Liang, Y., Vogel, J.L., Narayanan, A., Peng, H. and Kristie, T.M. (2009). Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks alpha-herpesvirus lytic replication and reactivation from latency. *Nat Med* **15**, 1312-1317.
- Lieberman, P.M. (2006). Chromatin regulation of virus infection. *Trends Microbiol* **14**, 132-140.
- Lopez-Turiso, J.A., Martinez, C., Tanaka, T. and Ortin, J. (1990). The synthesis of influenza virus negative-strand RNA takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction. *Virus Res* **16**, 325-337.
- Lutz, T., Stoger, R. and Nieto, A. (2006). CHD6 is a DNA-dependent ATPase and localizes at nuclear sites of mRNA synthesis. *FEBS Lett* **580**, 5851-5857.
- Mayer, D., Molawi, K., Martinez-Sobrido, L., Ghanem, A., Thomas, S., Baginsky, S., *et al.* (2007). Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches. *J Proteome Res* **6**, 672-682.
- Mellor, J. (2005). The dynamics of chromatin remodeling at promoters. *Mol Cell* **19**, 147-157.
- Mujtaba, S., Manzur, K.L., Gurnon, J.R., Kang, M., Van Etten, J.L. and Zhou, M.M. (2008). Epigenetic transcriptional repression of cellular genes by a viral SET protein. *Nat Cell Biol.* **10**, 1114-1122
- Neely, K.E., Hassan, A.H., Wallberg, A.E., Steger, D.J., Cairns, B.R., Wright, A.P. and Workman, J.L. (1999). Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. *Mol Cell* **4**, 649-655.
- Nioi, P., Nguyen, T., Sherratt, P.J. and Pickett, C.B. (2005). The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **25**, 10895-10906.
- Pérez-González, A., Rodríguez, A., Huarte, M., Salanueva, I.J. and Nieto, A. (2006).

- hCLE/CGI-99, a human protein that interacts with the influenza virus polymerase, is a mRNA transcription modulator. *J. Mol. Biol.* **362**, 887-900.
- Plotch, S.J., Bouloy, M., Ulmanen, I. and Krug, R.M. (1981). A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**, 847-858.
- Reeves, M., Murphy, J., Greaves, R., Fairley, J., Brehm, A. and Sinclair, J. (2006). Autorepression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter/enhancer at late times of infection is mediated by the recruitment of chromatin remodeling enzymes by IE86. *J Virol* **80**, 9998-10009.
- Rodriguez, A., Perez-Gonzalez, A., Hossain, M.J., Chen, L.M., Rolling, T., Perez-Brena, P., *et al.* (2009). Attenuated strains of influenza A viruses do not induce degradation of RNA polymerase II. *J Virol* **83**, 11166-11174.
- Rodriguez, A., Pérez-Gonzalez, A. and Nieto, A. (2007). Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II. *J Virol* **81**, 5315-5324.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., *et al.* (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**, 407-411.
- Schuster, E.F. and Stöger, R. (2002). CHD5 defines a new subfamily of chromodomain-SW12/SNF2-like helicases. *Mammalian genome* **13**.
- Shapira, S.D., Gat-Viks, I., Shum, B.O., Dricot, A., de Grace, M.M., Wu, L., *et al.* (2009). A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection. *Cell* **139**, 1255-1267.
- Sims, R.J., 3rd, Chen, C.F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S.S. and Reinberg, D. (2005). Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J Biol Chem* **280**, 41789-41792.
- Sims, R.J., 3rd, Millhouse, S., Chen, C.F., Lewis, B.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., *et al.* (2007). Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **28**, 665-676.
- Smith, J.A., White, E.A., Sowa, M.E., Powell, M.L., Ottinger, M., Harper, J.W. and Howley, P.M. (2010). Genome-wide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and

- Brd4 as E2-dependent regulators of human papillomavirus oncogene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3752-3757.
- Soria, C., Estermann, F.E., Espantman, K.C. and O'Shea, C.C. Heterochromatin silencing of p53 target genes by a small viral protein. *Nature* **466**, 1076-1081.
- Takizawa, N., Watanabe, K., Nouno, K., Kobayashi, N. and Nagata, K. (2006). Association of functional influenza viral proteins and RNAs with nuclear chromatin and sub-chromatin structure. *Microbes Infect* **8**, 823-833.
- Taylor, T.J. and Knipe, D.M. (2004). Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8. *J Virol* **78**, 5856-5866.
- Vreede, F.T., Chan, A.Y., Sharps, J. and Fodor, E. (2010). Mechanisms and functional implications of the degradation of host RNA polymerase II in influenza virus infected cells. *Virology* **396**, 125-134.
- Wu, D.Y., Krumm, A. and Schubach, W.H. (2000). Promoter-specific targeting of human SWI-SNF complex by Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *J Virol* **74**, 8893-8903.
- Zegerman, P., Canas, B., Pappin, D. and Kouzarides, T. (2002). Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J Biol Chem* **277**, 11621-11624.
- Zhirnov, O.P. and Klenk, H.D. (1997). Histones as a target for influenza virus matrix protein M1. *Virology* **235**, 302-310.
- Zinner, R., Albiez, H., Walter, J., Peters, A.H., Cremer, T. and Cremer, M. (2006). Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones. *Histochem Cell Biol* **125**, 3-19.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1

**CHD6 interacts with influenza virus polymerase proteins.** (A); CHD6 interacts with PA in a yeast two-hybrid screening. Entire PA (GBD-PAwt),

PA protein lacking the first 154 aa (GBD-PA $\Delta$ 1-154). (B); CHD6 interacts with the polymerase complex. HEK293T cells were MOCK-infected or infected with the VIC strain and the nuclear extracts were analyzed by immunoprecipitation. The presence of CHD6, PB2, PA and PB1 proteins was monitored by Western blots probed with the corresponding antibodies. (Input), represents the HEK293T nuclear extracts, ( $\alpha$ -CHD6) the immunoprecipitate using an antibody against CHD6, (C) the immunoprecipitate with a control antibody. (M), Mock-infected cells; (V), influenza virus infected cells. (C); A549 cells were MOCK-infected or infected with influenza virus and at 9 hpi, the cells were fixed and processed for immunofluorescence assays using antibodies against CHD6 and NP. The CHD6-NP panels show the signals common to the corresponding two antibodies obtained with the colocalization mask. The experiment was repeated three times and a representative image is shown.

## Figure 2

**CHD6 and viral NP *in vitro* association with H3K9me3 and H3K27me3 in influenza infected cells.** (A); Nuclear extracts from infected HEK293T cells at 9 hpi were precleared with avidin beads and the unbound material was incubated with resins containing amino acids 1-21 of the histone 3 tail unmethylated (H3(1-21)) or trimethylated at lysine 4 (H3K4me3) or 9 (H3K9me3), or amino acids 21-44 of the histone 3 tail unmethylated (H3(22-44)) or trimethylated at lysine 27 (H3K27me3). The beads were extensively washed, and NP binding was analyzed by Western blot. (B); Similar to part A, but using nuclear extracts from uninfected (left) or infected (right)

HEK293T cells. The bound proteins were analyzed by Western blots with specific antibodies against the indicated proteins

### Figure 3

**The association of CHD6 with methylated lysines of histone 3 tails changes during influenza virus infection.** A549 cells were MOCK-infected or infected with influenza virus and at 9 hpi the cells were fixed and processed for immunofluorescence assays using anti-CHD6 plus anti-H3K4me3, or anti-H3K9me3, or anti-H3K27me3 antibodies. The CHD6-H3Kme3 panels show the signals common to the corresponding two antibodies obtained with the colocalization mask followed by a magnified view of the cells marked with arrows. The experiment was repeated three times and representative images are shown. The graph shows quantification of the colocalization of individual cells coming from three different sections of three independent experiments. Standard deviations are indicated by bars, asterisks (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.0001$ ) indicate statistical significance determined by Student's T-test. The corresponding numbers are: MOCK H3K4me3,  $n=12$ ; 9 hpi H3K4me3,  $n=16$ ; MOCK H3K9me3,  $n=12$ ; 9 hpi H3K9me3,  $n=14$ ; MOCK H3K27me3,  $n=12$ ; 9 hpi H3K27me3,  $n=16$ .

### Figure 4

**CHD6 knock-down does not affect the association of vRNPs with methylated lysines of histone 3 tails during influenza virus infection.** (A); A549 cells were stably transfected with plasmids expressing a nonsilencer RNAi (TM) or specific RNAi silencers for the CHD6 gene (siCHD6.1 and siCHD6.2). The accumulation levels of CHD6 were evaluated by Western

blot and immunofluorescence analysis. (B); Control A549 cells (TM), or CHD6-silenced (siCHD6.2) were infected with influenza virus and at 9 hpi the cells were fixed and processed for immunofluorescence assays using anti-NP plus anti-H3K9me3, or anti-H3K27me3 antibodies. The NP-H3Kme3 panels show the signals common to the corresponding two antibodies obtained with the colocalization mask. The experiment was repeated three times and representative images are shown.

### **Figure 5**

**Effect of CHD6 silencing on influenza virus replication.** (A); Cultures of stable CHD6-silenced A549 cells (siCHD6.1 and siCHD6.2) or control-silenced (TM) cells were infected at a moi of  $10^{-3}$  pfu/cell and at the designated hpi cell extracts were taken and the indicated proteins were monitored by Western blotting. (B); Aliquots of the culture supernatants of kinetics of panel A were collected at the indicated times after infection and the virus titer was determined by plaque assay in MDCK cells.

### **Figure 6**

**The accumulation levels of H3K4me3 decrease in influenza virus infected cells.** (A); A549 cells were MOCK-infected (M), or infected with influenza virus (V) and at the times indicated, total cell extracts were analyzed in Western blots probed with specific antibodies against the indicated proteins. (B); A graph representing the mean of H3K4me3/ $\beta$ -tubulin ratios from three independent experiments is shown. (C); Similar to part A using the antibodies against the indicated proteins.



Fig. 1

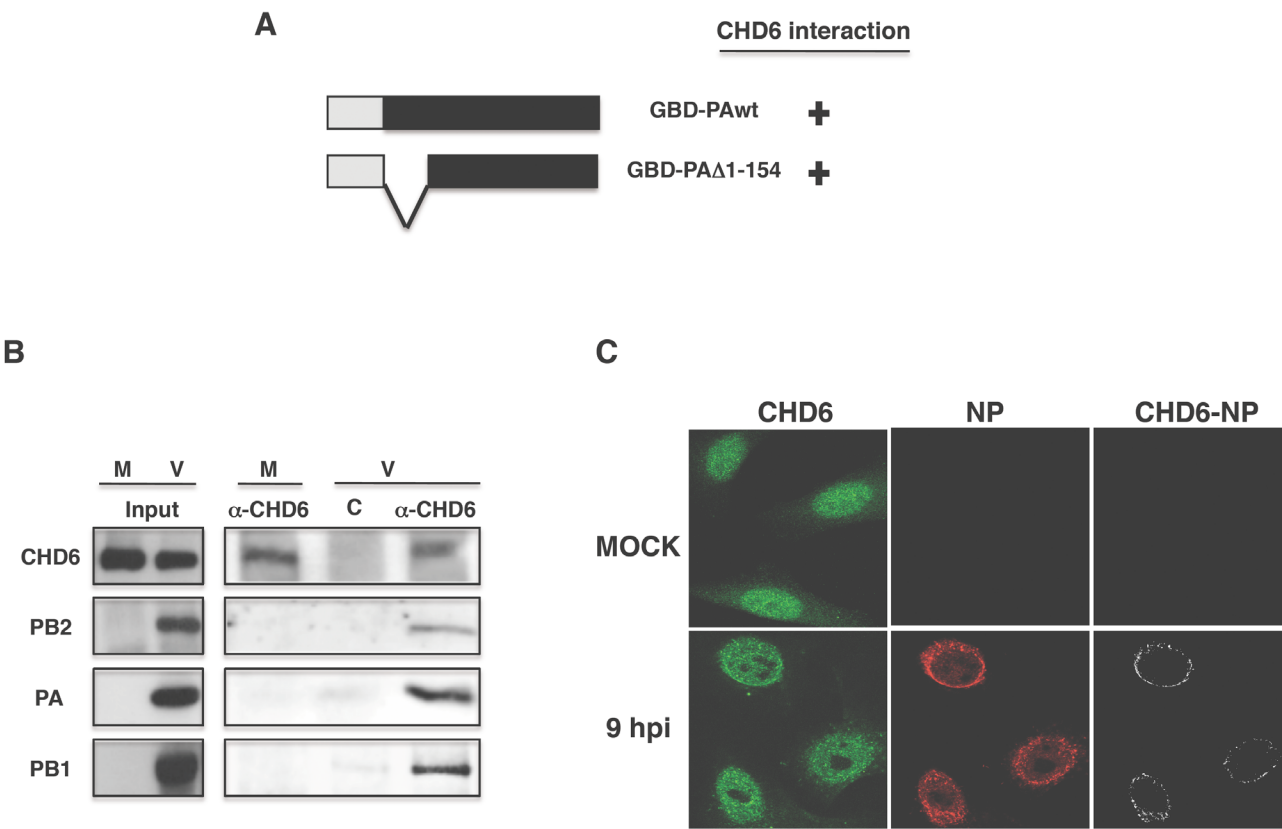


Fig. 2

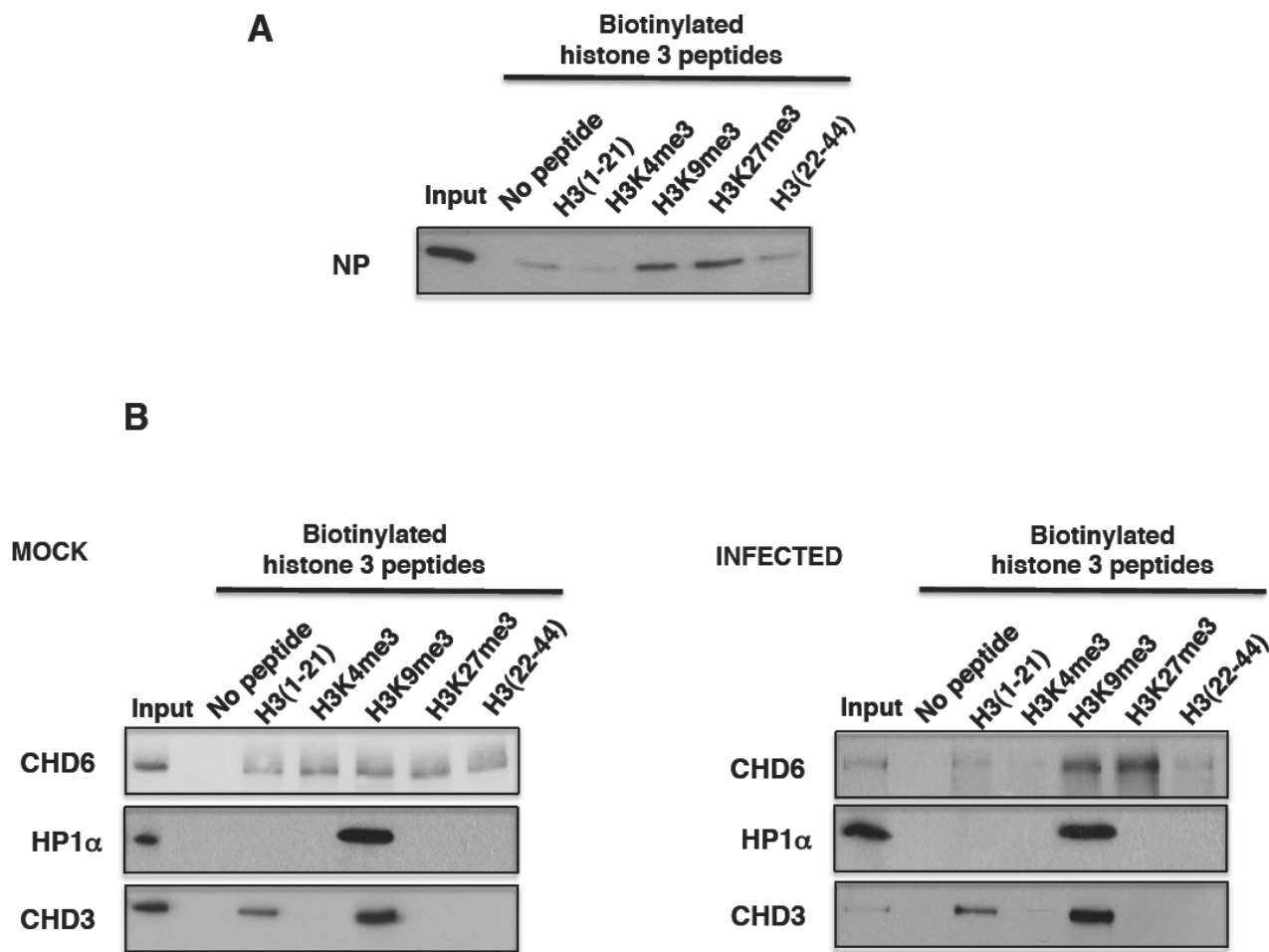


Fig. 3

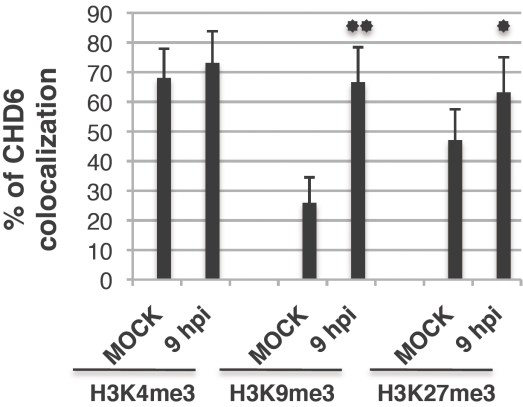
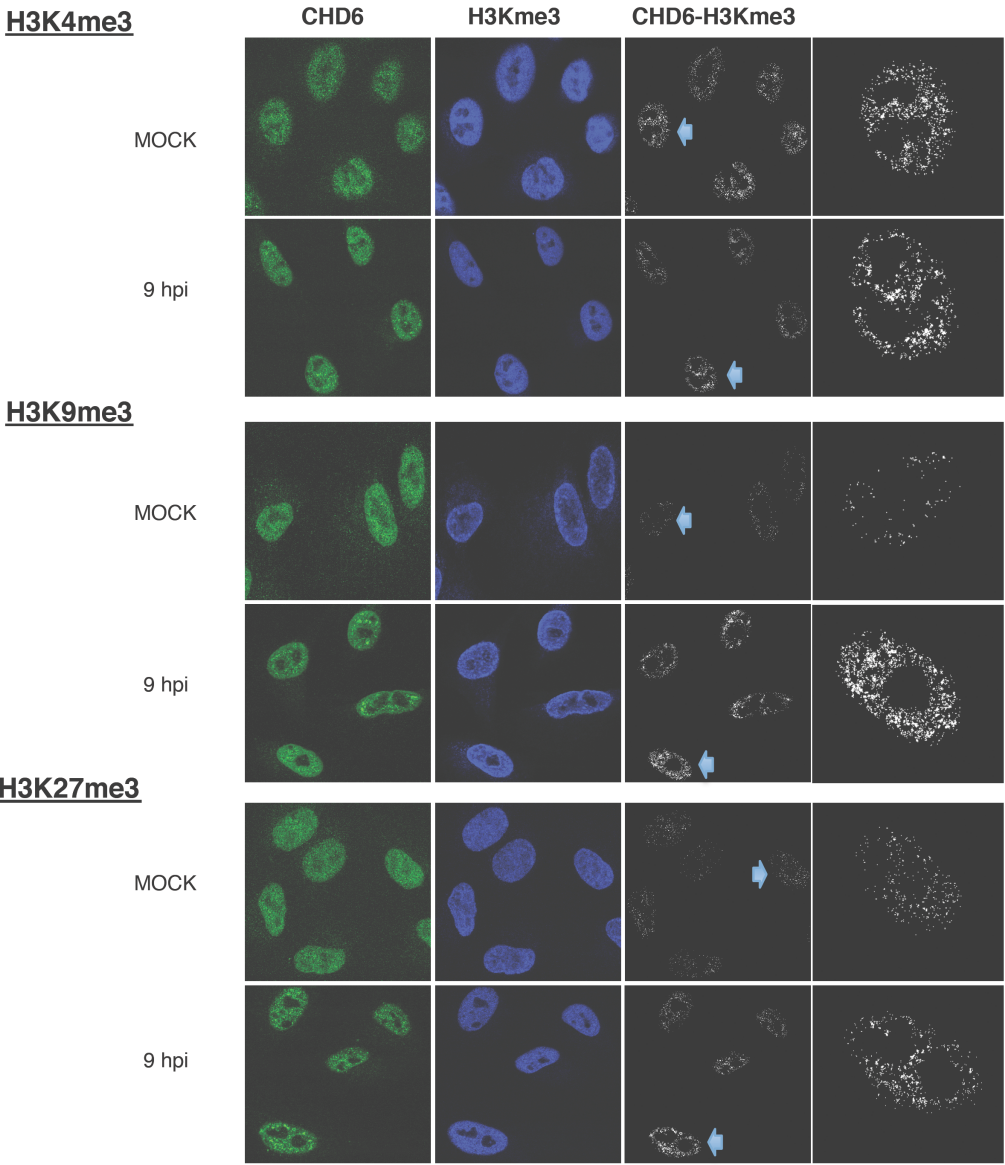


Fig. 4

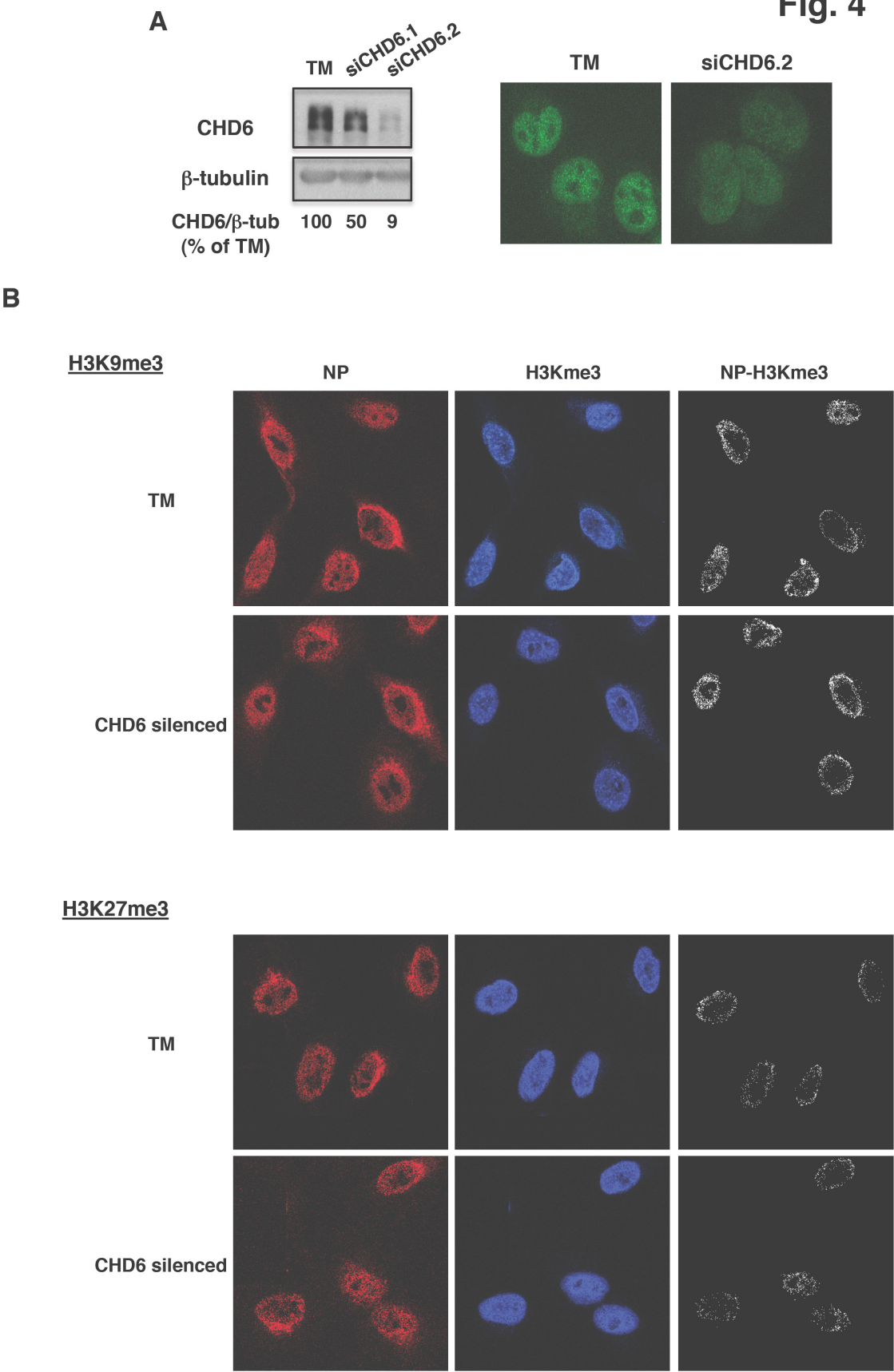


Fig. 5

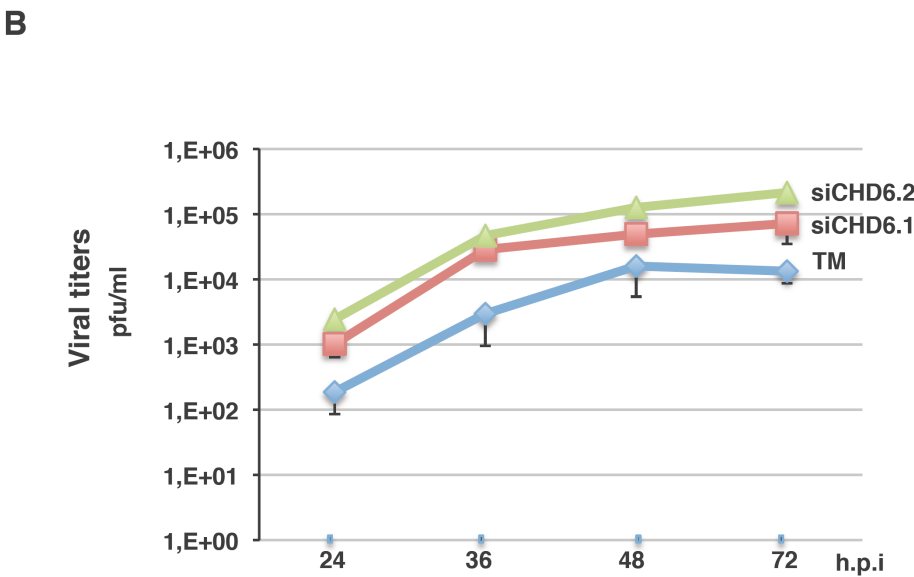
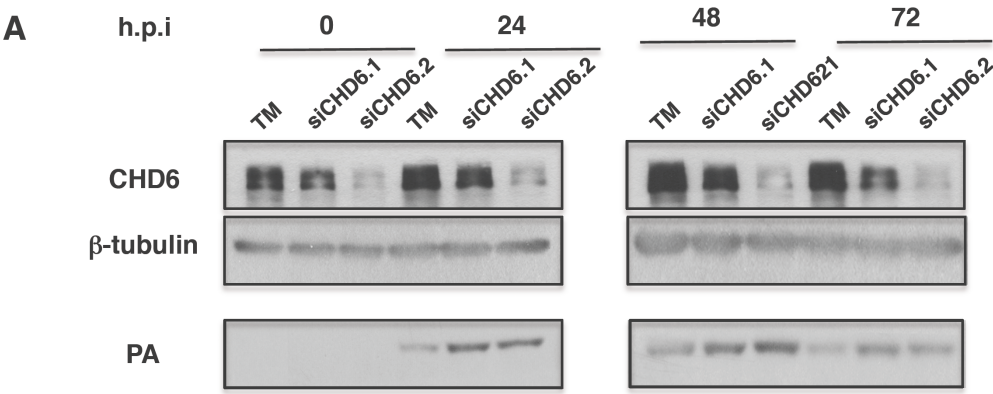


Fig. 6

